

**ULTRAHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER
DIE VERMEHRUNG DES PARAMYXOVIRUS 107 IN
AFFENNIEREN- UND FÖTALEN
RINDERLUNGENZELLKULTUREN**

Brigitte Hüppe

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr
Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Prof. Dr. H. Mahnel
Prof. Dr. P.A. Bachmann

ULTRAHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
VERMEHRUNG DES PARAMYXOVIRUS 107 IN
AFFENNIEREN- UND FÖTALEN
RINDERLUNGENZELLKULTUREN



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Brigitte Hüppe, geb. Kröninger
aus
Birkenfeld
München 1978

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich

Referent: Prof. Dr. H. Mahnel

Korreferent: Prof. Dr. P. Walter

Tag der Promotion: 24. Februar 1978



INHALT

Seite

I. ALLGEMEIN

II. THEORETISCHES

1.1. Einleitung	1
1.2. Die Aufgaben der Pädagogik	2
1.3. Die Methoden der Pädagogik	3
1.4. Die Grundlagen der Pädagogik	4
1.5. Die Bedeutung der Pädagogik für die Gesellschaft	5
1.6. Die Entwicklung der Pädagogik	6
1.7. Die Aufgaben der Pädagogik in der Gegenwart	7
1.8. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	8
1.9. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	9
1.10. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	10
1.11. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	11
1.12. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	12
1.13. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	13
1.14. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	14
1.15. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	15
1.16. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	16
1.17. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	17
1.18. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	18
1.19. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	19
1.20. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	20

Meinen lieben Eltern gewidmet

2.1. Die Aufgaben der Pädagogik in der Gegenwart	21
2.2. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	22
2.3. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	23
2.4. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	24
2.5. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	25
2.6. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	26
2.7. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	27
2.8. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	28
2.9. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	29
2.10. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	30
2.11. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	31
2.12. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	32
2.13. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	33
2.14. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	34
2.15. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	35
2.16. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	36
2.17. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	37
2.18. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	38
2.19. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	39
2.20. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	40

III. PRAKTISCHES

3.1. Die Aufgaben der Pädagogik in der Gegenwart	41
3.2. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	42
3.3. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	43
3.4. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	44
3.5. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	45
3.6. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	46
3.7. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	47
3.8. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	48
3.9. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	49
3.10. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	50
3.11. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	51
3.12. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	52
3.13. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	53
3.14. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	54
3.15. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	55
3.16. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	56
3.17. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	57
3.18. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	58
3.19. Die Aufgaben der Pädagogik in der Zukunft	59
3.20. Die Bedeutung der Pädagogik für die Zukunft	60

Inhaltsverzeichnis

	Seite:
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Schrifttum</u>	2
2.1. Klassifizierung der Paramyxoviren	2
2.1.1. Genus Paramyxovirus	2
2.1.2. Genus Morbillivirus	4
2.2. Aufbau der Paramyxoviren	7
2.3. Überblick über den Reproduktionszyklus von Paramyxoviren	9
2.4. Züchtung und Vermehrung der Morbilliviren	13
2.4.1. Masernvirus	13
2.4.2. SSPE-Virus	15
2.4.3. Staupevirus	16
2.4.4. Rinderpestvirus	17
2.4.5. Paramyxovirus 107	17
2.5. Ultrahistologische Befunde über die Vermehrung von Morbilliviren in Zellen	19
2.5.1. Masernvirus	20
2.5.2. SSPE-Virus	24
2.5.3. Staupevirus	27
2.5.4. Rinderpestvirus	28
3. <u>Eigene Untersuchungen</u>	30
3.1. Material und Methoden	30
3.1.1. Virus	30
3.1.2. Zellkulturen	30
3.1.3. Infektion der Zellkulturen	31
3.1.4. Zellgewinnung und Einbettung	32
3.1.5. Ultrahistologie	32

	Seite:
3.2. Versuche und Ergebnisse	33
3.2.1. Vermehrung in BEL-Zellen	34
3.2.2. Vermehrung in CV ₁ -Zellen	35
4. <u>Besprechung der Ergebnisse</u>	47
5. <u>Zusammenfassung</u>	51
6. <u>Literaturverzeichnis</u>	53

1. Einleitung

Im Rahmen der Erforschung ungeklärter Encephalitiden isolierten BACHMANN et al. (1975) ein Paramyxovirus (PMV 107) von einem zentralnervös erkrankten Rind. In dem beschriebenen Fall hatte das Virus eine Meningoencephalitis mit diffuser lymphozytärer Infiltration der Gewebe, Proliferation von Astrozyten, Mikroglia und Neuronophagie hervorgerufen.

Bei der Klassifizierung des Isolates PMV 107 wurde eine Verwandtschaft zum Erreger der SSPE nachgewiesen.

Die SSPE (subakut sklerosierende Panencephalitis) ist eine "slow-virus-Infektion" des zentralen Nervensystems, die vor allem bei Kindern und Jugendlichen beobachtet wird, welche in ländlichen Gegenden aufwachsen. Es wird ein Zusammenhang zwischen einer vorausgegangenen Masernvirus-Infektion und dem Auftreten von SSPE vermutet.

Infiziert man Kälber mit SSPE-Virus, so entstehen die gleichen pathologisch-anatomischen Veränderungen, wie sie bei der PMV 107-Infektion zu beobachten waren (THEIN et al., 1972).

Bei der Charakterisierung und Differenzierung verwandter Virusarten sind die biologischen Eigenschaften, insbesondere auch die Vorgänge bei der zellulären Virussynthese, von besonderem Interesse. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, in diesem Zusammenhang die Vermehrung des PMV 107 in empfänglichen Kulturzellen anhand der ultrahistologisch feststellbaren, virusspezifischen Zellvorgänge zu untersuchen und die Befunde mit den vorliegenden entsprechenden Erkenntnissen bei Masern- und SSPE-Viren zu vergleichen.

2. Schrifttum

2.1. Klassifizierung der Paramyxoviren

Die Paramyxoviren hat das "International Committee on Taxonomy of Viruses" (ICTV) in der Familie der Paramyxoviridae zusammengefaßt (FENNER 1976) und in drei Genera gegliedert, PARAMYXOVIRUS, MORBILLIVIRUS und PNEUMOVIRUS. ANDREWES et al. (1955) hatten zunächst eine Reihe morphologisch ähnlicher Erreger, wie Influenza-, Mumps- und Newcastle Disease-Virus als Myxoviren gruppiert. Sie wurden später in die Untergruppen I und II unterteilt (WATERSON, 1962), aufgrund der grundlegenden Unterschiede im Aufbau mit ORTHOMYXOVIRUS und PARAMYXOVIRUS bezeichnet und erhielten den Status von selbständigen Genera, später von Familien. Innerhalb der Paramyxoviren differenzierte man zwischen Parainfluenzaviren, heute Genus PARAMYXOVIRUS, und den sogenannten Medipest-Viren, bestehend aus den nahe verwandten Arten von Masern, Staupe und Rinderpest, heute als Genus MORBILLIVIRUS benannt. Die den Paramyxoviren ebenfalls im Aufbau sehr ähnlichen, aber im Nukleokapsid-durchmesser abweichenden sog. Metamyxoviren, die die Respiratory Syncytial-Viren umfassen, sind derzeit als drittes Genus PNEUMOVIRUS ebenfalls den PARAMYXOVIRIDAE angegliedert.

2.1.1. Genus Paramyxovirus

Diesem Genus gehören alle Parainfluenzaviren der Serotypen 1-4 sowie das Newcastle Disease-Virus (ND-Virus) und das Mumps-Virus an. Das ND-Virus stellt den Prototyp dieses Genus. Alle vier Parainfluenza-Serotypen wurden mit Erkrankungen der oberen Luftwege bei Kindern in Verbindung gebracht (JACKSON und MULDOON, 1973). Parainfluenza-Virus Typ 4 ist nur für den Menschen pathogen.

Bei der Maus kann das Parainfluenza-Virus Typ 1 fatale Pneumonien auslösen, man hat das Virus 1953 isoliert und als Sendai-Virus bezeichnet (KUROYA, 1953). Nach intra-

cerebraler Infektion von Mäusen, ist es in der Lage eine chronische Encephalitis hervorzurufen (MIMS und MURPHY, 1973). TER MEULEN et al. (1972a) sowie TANAKA et al. (1975) beschrieben eine Encephalitis bei der Maus, die von Stamm 6/94 des Parainfluenza 1-Virus, das aus dem Gehirn eines Multiple-Sklerose-Patienten isoliert wurde, ausgelöst wird. Parainfluenza-Virus Typ 2 ist unter natürlichen Bedingungen für Mensch, Affe und Hund pathogen. Ein, dem von Affen isolierten, eng verwandtes SV 5-Virus ließ sich später auch bei Hunden mit Zwingerhusten nachweisen (BINN, 1967).

Das Parainfluenza-Virus Typ 3 ist hauptsächlich für Menschen und Rinder pathogen. Es löst beim Rind unter Mitwirkung anderer exogener und endogener Stressoren ein unter dem Namen "shipping fever" bekanntes Krankheitsbild aus, das durch eine schwere fieberhafte Bronchopneumonie charakterisiert ist (WIZIGMANN, 1972). Die Beteiligung des Parainfluenza-Virus Typ 3 an der sogenannten enzootischen Pneumonie des Rindes ist erwiesen, es handelt sich jedoch um eine Faktorenerkrankung, für deren Übergang von der Infektion zur Krankheit Helferviren oder auch Bakterien benötigt werden (WIZIGMANN, 1974a;b).

Das Newcastle Disease-Virus (ND-Virus) ruft vor allem bei Hühnervögeln eine gefürchtete, hochkontagiöse Erkrankung der Respirations- und Verdauungsorgane hervor, die 1926 zum ersten Mal beobachtet wurde. Die Newcastle Disease wurde später von der klassischen Geflügelpest (Orthomyxovirus) abgetrennt und als "Atypische Geflügelpest" bezeichnet (ROLLE und MAYR, 1978).

Dem Genus Paramyxovirus wird ferner das Mumps-Virus zugeordnet, das beim Menschen Parotitiden verursacht, die bei einem Teil der Erkrankten mit einer Meningoencephalitis und, beim männlichen Patienten, mit einer Orchitis einhergehen können.

2.1.2. Genus Morbillivirus (Masern-Staupe-Rinderpest)

MELNICK und MC.COMBS (1966) bezeichneten diese Virusgruppe vor der derzeitigen Ordnung und Benennung durch das ICTV als Medipest-Viren.

Das Masern-Virus ruft eine fieberhafte mit Exanthemen einhergehende Erkrankung des Menschen im Kindesalter hervor. Vereinzelt kann es dabei auch zu neurologischen Komplikationen kommen, die dann 3 bis 10 Tage nach dem Ausbruch des Exanthems auftreten. TER MEULEN et al. (1972b) gelang es, von einem Patienten, der 3 Tage nach einem akuten Masern-Anfall eine Encephalitis entwickelte und nach sechs-wöchiger Krankheit starb, Masernvirus zu isolieren.

Die Autoren vermuten ferner einen Zusammenhang zwischen überstandenen Masern-Infektionen und der Subakut Sklerosierenden Panencephalitis (SSPE), da SSPE-Patienten immer einen hohen Gehalt an Serumantikörpern gegen Masern besitzen und stets 4-8 Jahre vor Beginn der SSPE-Erkrankung eine klinisch manifeste Masern-Infektion durchmachten. Die SSPE ist eine typische "slow-virus-disease" mit schwersten zentralnervösen Erscheinungen, die immer tödlich endet. Obwohl schon 1931 von BODECHTEL und GUTTMANN eine Encephalitis dieser Art beschrieben wurde - der Name der Erkrankung war noch ein anderer -, war erst 1965 die Suche nach viralem Ursprung der Krankheit erfolgreich. Einschlußkörperchen in Gehirnzellen von SSPE-Patienten enthielten Nukleokapside von Paramyxoviren (BOUTEILLE et al., 1965). In späteren Untersuchungen wurden extrem hohe Masern-Antikörpertiter in den Seren von SSPE-Patienten, sowie Masern-Antigen in den Gehirnzellen dieser Patienten festgestellt (CONNOLLY et al., 1967; FREEMAN et al., 1967). Die SSPE wird als Zoonose diskutiert, da sie vor allem in ländlichen Gegenden auftritt (BRODY and DETELS 1970) und der Erreger vermutlich mit dem Paramyxovirus 107 antigenetisch verwandt ist.

Das Staupe-Virus steht dem Masernvirus ebenfalls sehr nahe. Mit Masernvirus ist es möglich, Hunde gegen Staupe zu immunisieren, jedoch nicht umgekehrt. Der Staupeerreger ist in unterschiedlichem Maße für alle Carnivoren pathogen; die wichtigste Rolle dürfte jedoch die Hundestaupe spielen. Neben der pulmonalen und der intestinalen kommt auch bei dieser Infektion eine zentralnervöse Verlaufsform vor. Eine Variante der Staupe ist die hard-pad-disease, die mit Hyperkeratinisierung der Sohlenhaut einhergeht (APPEL und GILLESPIE, 1972).

HALL und TER MEULEN (1976) haben die 18S RNS von 3 SSPE-Stämmen (Mantooth, Lec and Jac), 2 Masern-Stämmen (Edmonston und Woodfolk), Staupe-Virus (Stamm Onderstepoort) und PMV 107 verglichen und herausgefunden, daß die 3 SSPE-Stämme ebenso wie die beiden Masern-Stämme untereinander identisch sind. Gegenüber Edmonston-Masern-Stamm ergab sich eine 100%ige Übereinstimmung mit den 3 SSPE-Stämmen und eine 30%ige Übereinstimmung mit Staupe- und PMV 107. Andere Ergebnisse brachte die Gegenüberstellung mit Mantooth-SSPE-Stamm. Mit ihm waren die beiden Masern-Stämme nur zu 90% identisch, was vermuten läßt, daß SSPE-Viren noch eine zusätzliche genetische Information tragen.

Die 18S RNS von Staupe- und PMV 107 teilten eine 38%ige Identität mit Mantooth-SSPE-Stamm, was für eine engere genetische Verwandtschaft zu SSPE- als zu Masern-Viren spricht.

Das Rinderpest-Virus, das vor allem in bestimmten Gebieten Afrikas und Asiens weit verbreitet ist, ruft eine akut bis subakut verlaufende, fieberhafte Allgemeinerkrankung mit Durchfall und hämorrhagisch-septikämischen Veränderungen der Schleimhaut, u.a. des Respirations- und Digestionstraktes, hervor. Eine zentralnervöse Verlaufsform der Erkrankung ist nicht bekannt. Das Virus hat ein großes Infektionsspektrum, es kommt bei allen Wiederkäuern vor; die größte Bedeutung wird ihm jedoch beim Hausrind und beim Wasserbüffel zugesprochen (PLOWRIGHT, 1968).

FAMILIE PARAMYXOVIRIDAE

Genus	Virusspezies	Kapsidbildung	Kapsidumhüllung	Wirte
PARAMYXO- Größe: 150-300nm ØNP-Strang: 18nm Hämagglutinin: + Neuraminidase: +	Parainfluenza 1	Cytoplasma (C)	Cytoplasmamembran (CM)	Mensch, Maus
	Parainfluenza 2	C	CM	Mensch, Affe, Hund
	Parainfluenza 3	C (N)	CM	Rind, Mensch
	Parainfluenza 4	C (N)	CM	Mensch
	Mumps	C (N)	CM	Mensch
	Newcastle	C (N)	CM	Geflügel
MORBILLI- Größe: 150-300nm ØNP-Strang: 18nm Hämagglutinin: (+) Neuraminidase: -	Masern	CN	CM	Mensch
	SSPE *	CN	CM	Mensch
	PMV 107	CN	CM	Wdk
	Staupe	CN	CM	Hund
	Rinderpest	CN	CM	Wdk
PNEUMO- Größe: 90-120nm ØNP-Strang: 12-15nm Hämagglutinin: - Neuraminidase: -	Respiratory			
	Syncytial	C	CM	Mensch, Rind
	Mäusepneumonie	C	CM	Maus

*evtl. Subspezies, Variante

2.2. Aufbau der Paramyxoviren

Der Aufbau der Paramyxoviren wurde vorwiegend am Beispiel des Newcastle Disease-Virus, des Sendai-Virus (Parainfluenza 1-Virus, des Simian Virus 5 (SV 5) und des Masernvirus untersucht. Es handelt sich um behüllte, RNS-haltige Viren mit einer Dichte im Cäsiumchloridgradienten von $1,24\text{g/cm}^3$. Ihre Größe liegt zwischen 120 und 300 nm. Die Trockenmasse des SV 5-Virus besteht zu 0,91% aus RNS, 73% Protein, 20% Lipiden und 6,1% Kohlenhydraten (KLENK und CHOPPIN, 1969a). Diese Werte sind auch für andere Paramyxoviren repräsentativ (CHOPPIN und COMPANS, 1975).

Das Nukleokapsid der Paramyxoviren ist helikal strukturiert, die Helix unregelmäßig geknäuelte. In der Helix, die 17-18 nm im Durchmesser und etwa 1.000 nm lang ist (CHOPPIN und STOECKENIUS, 1964), liegt die einsträngige "negative" (im Sinne der Lesbarkeit) RNS eingebettet; innen ist ein Hohlraum, dessen Durchmesser 5 nm beträgt (WATERS und BUSSEL, 1974). Die überwiegende Zahl der Paramyxoviren enthält nur eine solche als Nukleokapsid verknäuelte Helix; es sind jedoch auch Partikel mit mehreren Nukleokapsiden bekannt. Die Helix besteht zu 4-5% aus Ribonukleinsäure, der Rest sind Proteine (KINGSBURY, 1974), die sich als Monomeren helikal um die Nukleinsäure anordnen. Diese Bausteine sitzen nicht senkrecht am Nukleinsäurestrang, sondern in einem Winkel von 60° , was zu der typischen fischgrätigen Struktur des Nukleokapsids führt. Nach MOUNTCASTLE et al. (1970) besitzt jedes Nukleokapsid etwa 2200-2600 Proteinuntereinheiten (Nukleokapsidprotein), pro Wendel der Helix 11-13 Monomeren mit einem Molekulargewicht von 60.000 (KINGSBURY, 1972). Zwischen den einzelnen Proteinuntereinheiten ist ein Freiraum von 45-55 Å (WATERSON, 1965). Die Paramyxovirus-RNS stellt ein einheitliches Molekül dar mit einem Molekulargewicht

von 6,5-7,5 Millionen (DUESBERG und ROBINSON, 1965), das in der Ultrazentrifuge bei 40-50 S sedimentiert (NAKAJIMA und OBARA, 1967).

Neben dem Nukleokapsidprotein ist bei einigen Paramyxoviren ein weiteres Protein mit dem Nukleokapsid vergesellschaftet (P-Protein), dessen MG je nach Virusart zwischen 50.000 und 69.000 liegt. Es stellt einen RNS-Transkriptase-Komplex dar (MOUNTCASTLE et al., 1971). Um das Nukleokapsid herum liegt eine doppelschichtige, lipidhaltige Hülle (LANDSBERGER et al., 1973). Die Lipidzusammensetzung ist ähnlich der der Membran von Zellen, in denen die Virusvermehrung stattgefunden hat (CHOPPIN et al., 1971; KLENK und CHOPPIN, 1969b), im Gegensatz zu den Proteinen, die virusspezifisch sind (CALIGUIRI et al., 1969). Mit der Hülle ist ein nicht-glykolysiertes Protein vergesellschaftet mit einem MG von 38.000-41.000. Es wird als M- oder Membranprotein bezeichnet und scheint mit den Lipiden für den Zusammenhalt der strukturellen Einheit des Virus verantwortlich zu sein (CHOPPIN und COMPANS, 1975).

Auf der Lipidmembran tragen Parainfluenzavirionen zahlreiche Oberflächenprojektionen (spikes), die 8-12 nm lang sind und an ihrem Ende knopfartige Auftreibungen besitzen (HORNE und WILDY, 1961; CHOPPIN und STOECKENIUS, 1964). Diese Spikes sind aus Glykoproteinen zusammengesetzt und lassen sich durch proteolytische Enzyme vom Virion trennen (CHEN et al., 1971). Zwei Glykoproteine lassen sich nachweisen, ein größeres mit einem MG von etwa 67.000 (HN) und ein kleines mit einem MG von ca. 56.000 (F). Im großen Glykoprotein sind das Hämagglutinin und die Neuraminidaseaktivität verankert, und zwar im gleichen Glykoprotein (SCHEID und CHOPPIN, 1973; TOZAWA et al., 1973). Das Hämagglutinin und die Neuraminidase sind wichtige Faktoren bei der Virusadsorption und -penetration (RUBIN, 1957; CHOPPIN und COMPANS, 1975). Das

Hämagglutinin ist nur bei den Virusarten des Genus Paramyxovirus vorhanden. Dem Staupe- und Rinderpestvirus sowie den Pneumoviren fehlt sowohl Hämagglutinin-als auch Neuraminidaseaktivität. Eine Zwischenstellung nimmt jedoch das Masernvirus ein, das ein Hämagglutinin besitzt.

Dem kleineren Glykoprotein in den Spikes der Paramyxoviren (F-Protein) wird eine wichtige Funktion bei der virusinduzierten Zellfusion und bei der Hämolyse zugeschrieben (SCHEID und CHOPPIN, 1974). Das F-Protein liegt im Sendavirus nach Züchtung in bestimmten Zellspezies als biologisch inaktives Precursor-Protein vor (FO, MG 67.000), das nach proteolytischer Spaltung (z.B. mit Trypsin) aktiviert werden kann (SCHEID und CHOPPIN, 1974).

Die beiden Glykoproteine HN und F sowie das Precursor-Protein FO enthalten darüberhinaus noch Kohlenhydrate.

2.3. Überblick über den Reproduktionszyklus von Paramyxoviren

Von KINGSBURY (1972) sowie CHOPPIN und COMPANS (1975) liegen ausgezeichnete Übersichten über die Reproduktion von Paramyxoviren vor. Die vorgelegten Ergebnisse sind vorwiegend an den Modellen des NDV, SV 5 und Sendavirus erarbeitet worden. Spätere Untersuchungen mit anderen Virusarten dieser Familie (Masern-, Staupevirus) führten jedoch zu ähnlichen Resultaten, so daß die gewonnenen Erkenntnisse als repräsentativ für alle Viren der Familie der Paramyxoviridae angesehen werden (CARTER et al., 1973; HALL und MARTIN, 1973; WINSTON et al., 1973). Trotz zahlreicher Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Strategie der Vermehrung variiert die Kinetik der Replikation in weiten Grenzen abhängig von der Virusspezies, der Wirtszelle und

und der Multiplizität der Infektion.

Hier soll nur ein Überblick über die Reproduktion - soweit es für das Verständnis der Ergebnisse notwendig erscheint - gegeben werden; für ausführliche Details sei der Interessierte an die genannten Übersichten verwiesen.

Die Adsorption läuft bei den Parainfluenzaviren über neuraminsäurehaltige Rezeptoren und ist prinzipiell ähnlich wie die Adsorption an Erythrozyten. Viele Paramyxoviren eluieren bei 37°C rasch wieder (CHOPPIN und COMPANS, 1975). Masernvirus sowie analog dazu vermutlich die anderen Virusarten des Genus Morbillivirus adsorbieren nicht an neuraminsäurehaltige Rezeptoren (NORRBY, 1962). Masernvirus eluiert auch nicht (ROSEN, 1961). Der exakte Adsorptionsmechanismus für Masernvirus ist nicht bekannt.

Nach der Adsorption kommt es zur Penetration, die einmal durch Aufnahme des Virion in toto in cytoplasmatische Vakuolen, die um das Virus gebildet werden (Viropexis, Phagozytose), erfolgen kann (MUSSGAY und WEIBEL, 1962; SILVERSTEIN und MARCUS, 1964; COMPANS et al., 1966), oder über den alternativen Mechanismus der Fusion zwischen Virus- und Zellmembran (MORGAN und HOWE, 1968). Vermutlich spielt bei diesem Mechanismus der Penetration das F-Glykoprotein, das funktionell mit der Zellfusion und der Infektivität vergesellschaftet ist, eine besondere Rolle.

Nach dem Eindringen des Nukleokapsids in das Cytoplasma kann das Virusgenom direkt, d.h. ohne Abbau des Nukleoproteins im Nukleokapsid, transkribiert werden (CHOPPIN und COMPANS, 1975). Die Einleitung der Synthese von Protein- und Nukleinsäure des Nachkommenvirus erfolgt durch eine im Nukleokapsid einiger Paramyxoviren enthaltene Transkriptase (HUANG et al., 1971; ROBINSON, 1971). Bei der Vermehrung spielt die zelluläre DNS-Synthese keine Rolle (KINGSBURY, 1962). Nach KINGSBURY (1974) können die

nächsten Schritte der Virusvermehrung wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Transkription - mit RNS-Polymerase wird virale messenger-RNS gebildet (mRNS).
2. Translation - mit Hilfe der mRNS werden virale Polypeptide (Monomeren- und Peplomerenproteine) und RNS-Polymerase synthetisiert.
3. Replikation - neue Virus-RNS entsteht (mit Hilfe der RNS-Polymerase)
4. Synthese des Nukleoproteins, Zusammentritt von Nachkommen-RNS und viralen helikalen Polypeptiden sowie Anlagerung an die Plasmamembran.
5. "budding" der Nachkommenvirionen, Elution aus der Zelle.

Die RNS-Synthese findet im Cytoplasma statt. PORTNER und KINGSBURY (1971) haben das Vorkommen virusspezifischer RNS auch im Kern beschrieben. Die Bedeutung ist jedoch nicht klar und derartige Befunde werden teilweise als pathologische Effekte ohne Funktion für die Virusvermehrung angesehen (SCHLUEDERBERG und CHAVANICH, 1974).

Der größte Teil der virusspezifischen Ribonukleinsäure in Newcastle Disease Virus-infizierten Zellen ist komplementär der Elternvirusgenom-RNS (KINGSBURY, 1966). Diese RNS ist sehr heterogen und besteht in der Hauptsache aus 18S-RNS, daneben aus 22S-, 35S- und nur wenig 50S-RNS. Ähnliche Verhältnisse liegen auch bei mit Mumpsvirus (EAST und KINGSBURY, 1971) und Masernvirus (CARTER et al., 1973) infizierten Zellen vor. Aus neueren Untersuchungen scheint gesichert, daß die komplementäre RNS (18-35S-RNS) die messenger-RNS darstellt (KINGSBURY, 1973). Über den Mechanismus der Synthese von 50S komplementärer- und 50S Genom-RNS dagegen besteht noch weitgehende Unklarheit, da bisher noch keine Enzyme bekannt sind, die diesen Schritt regulieren.

Fluoreszenzserologische Untersuchungen zeigen, daß auch die Proteinsynthese ausschließlich im Cytoplasma abläuft (WHEELLOCK und TAMM, 1959). Neuere biochemische Daten bestätigen und vervollkommen diese Ergebnisse (CHOPPIN und COMPANS, 1975).

Bei einigen Paramyxovirusarten (Morbilliviren; PI 3-Virus) werden Antigene, Einschlußkörperchen oder Nukleokapside regelmäßig auch im Zellkern gefunden. Alle Untersuchungen weisen jedoch daraufhin, daß diese Ansammlungen im Kern, die gewöhnlich während der späten Vermehrungsstadien im Kern gefunden werden, aus Einwanderung des Materials vom Cytoplasma in den Kern resultieren.

Lipide und Kohlenhydrate stammen, wie schon angeführt, von der Wirtszellmembran, sie werden nicht virusspezifisch synthetisiert. Nach Synthetisierung der einzelnen Virusaufbaustufen dringen virale Glycoproteine (Peplomeren) in die Plasmamembran ein und verdrängen deren Protein. Virales Membranprotein legt sich innen an die modifizierte Plasmamembran an und die Nukleokapside reihen sich entlang dieser Membran auf (alignment). Inzwischen wachsen die viralen Glycoproteine an der Außenseite der Plasmamembran zu sichtbaren Projektionen an. An dieser Stelle beginnt sich die Zellmembran auszustülpen, wird an der Basis abgeschnürt, und das neugebildete Virus ist frei. Dieser Vorgang wird in der Literatur als "budding" bezeichnet und ist mit einer umgekehrten Phagozytose vergleichbar.

2.4. Züchtung und Vermehrung der Morbilliviren

Alle Morbilli-Viren vermehren sich in empfänglichen Zellkulturen in vitro. An den infizierten Kulturzellen lassen sich dabei in der Regel lichtmikroskopisch cytopathische Effekte (CPE) beobachten wie Cytolyse, Degenerationen, Syncytien und Einschlusskörperchenbildung in Zellkern und Zellplasma. Die Art, der zeitliche Ablauf und die Stärke der CPE-Ausbildung steht in Zusammenhang mit der zellulären Virussynthese und variiert in Abhängigkeit von Virusart, Stamm, Zellsystem und anderen Faktoren.

2.4.1. Masernvirus

Masernviren haben ein sehr weites Wirtsspektrum. Sie lassen sich hauptsächlich in Kulturen aus folgenden Zelltypen züchten (nach MAYR et al., 1974):

- Affennieren (Rhesus)
- Affennieren (Cercopithecus)
- Mensch Nieren
- Mensch Amnion
- Kälbernieren
- Hundenieren
- Hamsternieren
- KB (Mensch)

In menschlichen Zellen vermehrt sich Masernvirus am schnellsten und mit rasch einsetzendem CPE (WATERSON, 1965). Zur Viruszüchtung hält er Affennierenzellen für am besten geeignet. NAKAI et al. (1969) haben BSC 1-Zellen, eine Affennierenzelllinie, mit dem Masernvirus-Stamm Edmonston infiziert und 15 h p.inf. den ersten CPE in Form kleinerer Syncytien beobachtet. 72-96 h p.inf. erreichte die Ausbildung des CPE ihren Höhepunkt. Mit Hilfe der Fluoreszenzmethode konnte nachgewiesen werden, daß zu diesem Zeitpunkt 80-90% der Zellen Masernvirus-Antigen enthielten.

Die Konzentration des zellgebundenen Virus war höher als die des freien Virus im Kulturmedium.

RUSTIGIAN (1966) berichtet von einer persistent mit Masernvirus (Stamm Edmonston) infizierten Zelllinie (HeLa-Zellen). Masernvirus-Antigen war in den meisten Zellen enthalten, jedoch wurde kein infektiöses Virus aus der Zelle freigesetzt. Auch KNIGHT et al. (1974) und MENNA et al (1975) beschrieben solche persistierenden Masernvirus-Infektionen in Zellkulturen, einmal in BGM/MV-Zellen (grüne Meerkatzen-Nierenzellen mit Masernvirus-infizierten Mäuse-Gehirnzellen co-kultiviert), zum anderen bei HEF-Zellen (Hühnerembryofibroblasten).

In produktiven, mit Masernvirus infizierten Zellsystemen, bei denen infektiöses Virus gebildet wird, kommt es etwa 24 h p.inf. zur Freisetzung von infektiösem Virus aus der Zelle. Werden BSC 1-Zellen (Affennierenzellen) über Co-kultivierung mit HEF-Zellen infiziert, die persistierendes Masernvirus (Stamm Schwarz) enthielten, ließ sich schon nach 6 Stunden zellfreies Virus nachweisen. So wird vermutet, daß es bei nicht produktiven (persistierenden) Infektionen zu einem Block in einem späten Stadium der zellulären Virusvermehrung kommt, der durch die Cokultivierung aufgehoben werden kann (KNIGHT et al., 1972).

HASPEL et al. (1973) haben den Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Vermehrung des Masernvirus in Kulturzellen untersucht. Bei permanent infizierten HEF-Zellen werden bei der normalen Bebrütungstemperatur von 37°C keine infektiösen Viruspartikel ins Kulturmedium abgegeben, bei 33,5°C jedoch eine geringe Virusmenge, wobei nach 72 h das Maximum des Virustiters im Medium erreicht wird. Nach Cokultivierung infizierter mit empfänglichen Zellen dagegen waren höhere Inkubationstemperaturen günstiger. 20 h nach der Cokultivierung wird das Maximum der Virusausschleusung bei 39°C erreicht.

2.4.2. SSPE-Virus

Zur Anzüchtung von SSPE-Virus eignen sich besonders Affen-nierenzelllinien (BSC 1, CV₁, AGMK, Vero), die HeLa-Zell-linie (mschl. Cervixcarzinomzellen) sowie diploide Gehirnzellen (Mensch, Maus, Hamster).

Nach der Infektion kommt es zur Ausbildung cytopathischer Effekte in Form von Riesenzellen und intraplasmatischen sowie intranukleären Einschlusskörperchen, die, im gefärbten Zellpräparat dargestellt, denen des Masernvirus gleichen (TER MEULEN et al., 1972c). RAINE et al. (1973) haben Gewebematerial von SSPE-Patienten auf HeLa, BSC 1- und Hamstergehirnzellen verimpft und nach 3 Tagen den ersten CPE beobachtet. Kulturen aus Gehirngewebe von SSPE-erkrankten Menschen wiesen nach längerer Bebrütungszeit zwar Riesenzellen auf, die Prüfung auf infektiöses Virus verlief jedoch negativ (TER MEULEN et al., 1972b). Dieses Ergebnis wird durch die Untersuchungen von UEDA et al. (1975) unterstützt.

Persistent mit SSPE-Virus infizierte Gewebekulturen wurden von BARBANTI-BRODANO et al. (1970) mit CV₁, AGMK und HeLa-Zellen kokultiviert. Nach 3-5 Tagen waren sehr große Syncytien zu erkennen, denen sich eine Cytolyse anschloß. Die Kulturen waren nach 10-12 tägiger Inkubation völlig zerstört. Die Kokultivierung bewirkte eine Freisetzung von infektiösem Virus aus den Zellen. DUBOIS-DALCQ et al. (1974) verglichen ein nicht produktives und ein produktives in vitro-SSPE-Virus-Zellsystem. Die Kokultivierung einer SSPE-Patienten-Gewebekultur mit HeLa-Zellen rief eine produktive Infektion hervor, jedoch wurde bei der von DOI et al. (1972) gezüchteten persistent mit SSPE-Virus infizierten Vero-Zelllinie auch nach Kokultivierung kein infektiöses freies Virus produziert.

Durch Kokultivierung kann auch ein umgekehrter Effekt auftreten. GREENHAM et al. (1974) untersuchten zwei verschie-

dene Isolate von SSPE-Patienten, die in Mäuse-Gehirnzellen produktive Infektionen verursachten. Nach Kokultivierung mit Vero-Zellen war ein Isolat jedoch nicht mehr in der Lage, infektiöses Virus zu bilden und persistierte in der Zelle.

Wegen der Ähnlichkeit im zellbiologischen Verhalten hat man vermutet, daß der SSPE-Erreger eine Variante des Masernvirus repräsentiert (HORTA-BARBOSA et al., 1969; PAYNE et al., 1969).

2.4.3. Staupevirus

Staupevirus vermehrt sich nur in einem sehr engen Wirtsspektrum von Zellen in vitro. Üblicherweise werden zur experimentellen Arbeit mit Staupeviren Kulturen aus Hühnerembryofibroblasten oder Affennieren benutzt (APPEL und GILLESPIE, 1972). Nach MAYR et al. (1974) sind auch Hep-2-Zellen (menschl. Larynxkarzinomzellen) geeignet.

Das Zellspektrum von Staupe-Feldvirus ist jedoch im Vergleich zu kulturadaptiertem Virus sehr viel kleiner. 10-13 h p. inf. kann man im Kulturmedium von Staupevirus-infizierten HEF-Zellen die ersten infektiösen Viruspartikel nachweisen, der höchste Virustiter ist bei optimalen Bedingungen nach 72-96 h erreicht. Ein cytopathischer Effekt bildet sich meist erst nach mehreren Passagen aus. In Affennierenzellen tritt der CPE etwas später ein als in Hundenierenzellen. Auch hier werden die Bildung von Riesenzellen sowie plasmatische und nukleäre Einschlusskörperchen beobachtet. Einen rascheren CPE und höhere Virusausbeuten erreicht man häufig in Rollerflaschen bei einer Brutungstemperatur von 35-36°C.

2.4.4. Rinderpest-Virus

Das Virus vermehrt sich in Kulturen von epithelialen Zellen und Fibroblasten von Wiederkäuern, Schwein, Hund, Hamster und Huhn. Auch Affennierenzellen eignen sich sehr gut (UNDERWOOD und BROWN, 1974). Bemerkenswert ist, daß in Kaninchenzellen (Nieren, embryonale Nieren und Hoden) keine Virusvermehrung stattfindet, obwohl Kaninchen in vivo zumindest für einige Rinderpest-Stämme empfänglich sind (PLOWRIGHT und FERRIS, 1959).

Die Zellen, in denen man den höchsten Virustiter erreicht, dürften die aus bovinen Nieren sein, wo nach 3-6 Tagen ein deutlicher CPE eintritt und 8-9 Tage p.inf. 50-80% der Zellen zu Riesenzellen verschmolzen sind. Auch beim Rinderpest-Virus erreicht man in Roller-Kulturen einen raschen CPE und höhere Infektionstiter im Kulturmedium, als bei stationären Kulturen (PLOWRIGHT, 1968). In infizierten Kulturen sind Form und Größe der Syncytien sehr von Virusstamm und Zelltyp abhängig. Im gefärbten Zellpräparat sieht man plasmatische und nukleäre Einschlußkörperchen, die sich stark eosinophil anfärben. Die nukleären Einschlußkörperchen bilden sich erst in einem etwas späteren Stadium der Infektion, hauptsächlich in den Kernen der Syncytien aus. GILBERT und MONNIER (1962) fanden heraus, daß Kerneinschlußkörper in BK (Rindernieren)-Zellen am 5.-6.Tag p.inf. auftreten und am 8. Tag p.inf. in nahezu allen Zellen vertreten sind.

Über die Kinetik und Produktion von Antigen liegen ausführliche Untersuchungen von LIESS (1966) vor.

2.4.5. Paramyxovirus 107 (PMV 107)

Die Isolierung des Erregers erfolgte durch Cokultivierung von Gehirnzellen aus Explantatkulturen von einem erkrankten Rind mit der Affennierenzelllinie CV₁. Zunächst traten

cytopathische Veränderungen nicht auf. Nach der 4. Subkultur der Zellen bildeten sich jedoch regelmäßig Riesenzellen mit nukleären und plasmatischen Einschlusskörperchen aus, die später lytisch wurden. Die Infektion ist jedoch nicht produktiv (BACHMANN et al., 1975). Große Mengen nicht-infektiöser Viruspartikel lassen sich regelmäßig im Überstand infizierter CV₁-Kulturen nachweisen, die Infektiosität ist jedoch $\leq 1 \log 10 \text{ KID}_{50}/\text{ml}$.

Das in vitro-Wirtsspektrum des PMV 107 ist relativ groß. Nach PFEIL (1976) läßt es sich in folgenden Zellkulturen züchten:

Mensch:	Humane diploide Vorhautzellen
Affe:	primäre Affennierenzellen Ritazellen Verozellen CV ₁ -Linie
Rind:	Schilddrüsen fetale Kälbernieren fetale Kälberhoden fetale Kälberlunge fetale Kälbermilz fetale Kälbergehirnzellen MDBK-Linie
Pferd:	Pferdeschilddrüsen
Schaf:	fetale Schaflunge fetale Schafhoden
Hund:	Hundenieren
Meerschweinchen:	fetale Fibroblasten
Goldhamster:	BHK-Zelllinie

Bei den meisten dieser Zellkulturen werden jedoch defekte, nichtinfektiöse Partikel gebildet, obwohl ein CPE regelmäßig beobachtet wird. Den raschesten und deutlichsten CPE erreicht man nach Infektion von Rinder- und Affenzellen

sowie einigen Klonen der BHK-Zelllinie. Hier kommt es 3-4 Tage p.inf. zum Höhepunkt der Syncytienbildung. Zu diesem Zeitpunkt kann eine infizierte Zellkultur zu 80-100% aus Riesenzellen bestehen, die bis zu 100 Kerne enthalten. Danach tritt rasche Lysis der Syncytien auf.

Plasmaeinschlußkörperchen sind bei der PMV 107-Infektion immer zu finden, das Auftreten nukleärer Einschlußkörperchen hängt von der Stärke der Virusvermehrung in einer Zellart und vom Stadium der Infektion ab.

Eine produktive Vermehrung von PMV 107 wurde lediglich in bovinen embryonalen Lungenzellkulturen (BEL) und in bovinen embronalen Milzzellen beobachtet. Am besten geeignet sind BEL-Zellen, bei denen Infektiositätstiter zwischen 10^4 und 10^6 KID₅₀/ml erreicht werden können. In embryonalen Rindermilzzellen liegen die Infektiositätstiter bei etwa 10^3 KID₅₀/ml. Obwohl dieses Phänomen auch für andere Paramyxoviren beschrieben ist, wie z.B. der Vermehrung von SV 5 in BHK- (defekte Vermehrung) und Affennierenzellen (produktive Vermehrung) (COMPANS et al., 1966), ist über den Mechanismus dieser wirtszellbedingten Unterschiede nichts bekannt.

2.5. Ultrahistologische Befunde über die Vermehrung von Morbilliviren in Zellen

Ultrahistologische Untersuchungen über zelluläre, mit Hilfe des Elektronenmikroskops erkennbare Schritte der Virussynthese und -reifung wurden überwiegend mit Masern-, SSPE- und Staupevirus durchgeführt.

Die wesentlichen Bildungsstadien scheinen für alle Morbilli-Viren einheitlich zu sein. Analog zu den lichtoptisch erkennbaren, spezifischen Veränderungen an virusinfizierten Kulturzellen, den plasmatischen und auch nukleären Einschlüssen, sind ultrahistologisch zuerst Stadien der

Nukleoproteinsynthese (NP-Synthese) in Form von filamentösen Strängen und Granula im Cytoplasma, aber auch im Kern infizierter Zellen zu beobachten. Aus diesem Material werden die Nukleokapside der Virionen gebildet. Bei normaler, produktiver Virusvermehrung, d.h. in der Zelle werden reife infektionstüchtige Viruspartikel gebildet, wie von WATERSON (1965) für eine Masernvirus-Infektion und von PLOWRIGHT (1968) für die in vitro Rinderpest-Infektion beschrieben, wandern die NP-Elemente an spezifisch veränderte Zellmembranabschnitte (alignment) und werden dort durch letztere umhüllt, sowie per Abschnürung als fertige Virionen freigesetzt (budding).

Diese Prozesse können bei den sogenannten nicht produktiven Infektionen, bei denen kein infektionstüchtiges, komplettes Virus gebildet wird, unvollständig sein, wie am Beispiel einer Masern- (RUSTIGIAN, 1966) oder SSPE-Infektion (TER MEULEN et al., 1972d) beschrieben. Ferner spielt dabei eine wesentliche Rolle, welche Zellspezies als Modell verwendet wird und ob die Virusvermehrung bzw. -infektion mit einem cytopathischen Effekt oder aber persistierend ohne Cytolyse einhergeht.

2.5.1. Masernvirus

KALLMAN et al. (1959) und TAWARA et al. (1961) untersuchten als erste Ultradünnschnitte von mit Masernvirus infizierten HeLa-Zellen mit dem Elektronenmikroskop, um die lichtoptisch als Einschlusskörperchen (EK) darstellbaren Zellveränderungen zu analysieren. Sie fanden im Cytoplasma und Nukleus tubuläre Gebilde mit einem äußeren Durchmesser von 15-20 nm. NAKAI und IMAGAWA (1969) beschrieben 18-20 h p.inf., zu einem Zeitpunkt bei dem plasmatische EK nachweisbar waren, filamentöse oder granuläre Strukturen in HeLa-Zellen mit etwa gleichem äußeren Durchmesser von 17-18 nm im Cytoplasma. Die filamentösen Strukturen zeigten den typischen fischgrätartigen Aufbau, die granulären

Strukturen ähnelten den Querschnitten, wie sie Nukleokapsidstränge der Mobilliviren aufweisen. 30-42 h p.inf. beobachteten sie dann eine stellenweise Verdickung der Zellmembran auf 10 nm, was der Stärke der Virushülle von Masernvirus entspricht (WATERSON et al., 1961). Später lagerten sich die Nukleokapsidstränge an die alterierten Zellmembranteile an (alignment). Im Spätstadium der Infektion, in dem nukleäre Einschlußkörperchen lichtoptisch darstellbar waren (96-120 h p.inf.), ließen sich im Elektronenmikroskop an den Dünnschnitten gleiche tubuläre Strukturen ausmachen wie im Cytoplasma. Die Kernmembran erschien jedoch unverändert. NAKAI und IMAGAWA sehen deshalb zwischen den Kerneinschlußkörperchen des Masernvirus und dem Virusreifungsprozess keinen Zusammenhang, da sie erst dann auftraten, als schon komplettes Virus in Form von "budding" die Zelle verlassen hatte. Granuläre und filamentöse Gebilde am Ort der Plasmaeinschlüsse mit dem etwa kleineren Durchmesser von 14-16 nm beschreiben ANISIMOVA et al. (1968) bei dem Edmonston-Stamm in BSC 1-Zellen.

Die filamentösen bzw. zum Teil granulös erscheinenden Strukturen und Gebilde, werden übereinstimmend als Nukleoprotein identifiziert, das sich zum Nukleokapsid des Virus formiert. Bei Anhäufungen dieses Materials kann offenbar die Strangstärke (14-20 nm) variieren. Unterschiede zwischen Nukleokapsiden im Kern und denen im Cytoplasma wurden jedoch nicht festgestellt (TAWARA, 1965); Lokalisation und Umfang der Nukleoproteinansammlungen variieren bei Masern-Infektionen wahrscheinlich in Abhängigkeit vom Zelltyp (NAKAI et al., 1969).

In primären MK-Zellen (Affennieren) ließen sich besonders im Zellkern viele röhrenförmige Strukturen mit ringförmigen Querschnitten und einem inneren und äußeren Durchmesser von 5 bzw. 15 nm darstellen. Die Länge der Nukleokapsidstränge war wegen ihrer zerknäuelten Lagerung nicht feststellbar; an einigen war die helikale Struktur deutlich

erkennbar, manche Zellkerne waren vollständig damit ausgefüllt. Häufiger jedoch bildeten diese Filamente einen runden, umschriebenen Bezirk, der nicht selten von einer Zone fibrillären oder granulären Materials umgeben war. Das Nukleoprotein schien weder eine Verbindung mit dem Kernchromation oder dem Nukleolus einzugehen, noch war die Kernmembran verändert. Im Cytoplasma dieser MK-Zellen dagegen sichteten die Autoren nur sehr wenige dieser Filamente. Verdichtete Zellmembranabschnitte und Buddingprozesse wurden nicht gefunden (NAKAI et al., 1969). Eine gegensätzliche Massierung der Nukleoproteinsynthese wiesen Masernvirus-infizierte BSC 1-Zellen auf. Dort fand man vorwiegend intraplasmatisch, 30 h p.inf., Bezirke mit angeordneten tubulären Strukturen, die 48 h p.inf. sehr an Menge zugenommen hatten. Weniger häufig waren diese Bezirke im Kern auszumachen. Die Nukleoproteinstränge im Plasma der BSC 1-Zellen waren nie von fibrillärem oder granulärem Material umgeben, wie man es in den Kernen der MK-Zellen gefunden hatte. Die Länge der Filamente betrug im Durchschnitt 1540 nm. 65 h p.inf. wurden die ersten Masern-Partikel aus der Zelle durch budding eluiert. Der Durchmesser dieser Viruspartikel war sehr unterschiedlich und variierte zwischen 300 und 1000 nm. In den meisten Partikeln ließ sich das Nukleokapsid erkennen, manche enthielten jedoch nur granuläres Material (NAKAI et al., 1969). Die Nukleokapside verschiedener Masern-infizierter Zellen erscheinen in der ultrahistologischen Darstellung häufig recht unterschiedlich. KILEY et al. (1974) beschrieben z.B. in Vero-Zellen drei unterschiedlich große Nukleokapsidstränge. Bei der chemisch-physikalischen Untersuchung der drei aus Zellen isolierten Nukleoproteine traten in der Sedimentationsgeschwindigkeit signifikante Unterschiede auf, außerdem erwiesen sich die Molekulargewichte ihrer Nukleinsäuren als unterschiedlich. Die Autoren kommen deshalb zu dem Schluß, daß bei der Masernvirus-Vermehrung zum Teil defekte Partikel mit sub-genomischer RNS entstehen.

Die ultrahistologische Untersuchung an Modellen persistent verlaufender Masernvirus-Infektionen ist im Vergleich zu produktiven Infektionen von besonderem Interesse. HENEEN et al (1973) untersuchten Lu 106-Zellen (humane Lungen), die persistent mit Masernvirus infiziert waren. Sie beschrieben Nukleokapside überwiegend im Cytoplasma, weniger häufig im Zellkern. Nach längerer Inkubation der Zellen legten sich Nukleokapside an die Zellmembran an, von der sie häufig durch Ruptur aus der Zelle freigelassen wurden. Große Nukleokapsidansammlungen im Cytoplasma fanden auch MENNA et al., 1975 bei einer persistenten Masern-Infektion von BGM/MV-Zellen (Affennierenzellen kokultiviert mit Masernvirus-infizierten Mäusegehirnzellen). Die Zellmembranen jedoch waren intakt und unverändert.

Persistierende, nichtproduktive Masernvirus-Infektionen von Kulturzellen lassen sich vielfach durch eine Kokultivierung mit Zellen anderer Spezies aktivieren. KNIGHT et al. (1974) untersuchten persistent infizierte HEF-Zellen (Hühnerembryofibroblasten) vor und nach Kokultivierung mit BSC 1-Zellen ultrahistologisch. Vor der Kokultivierung beobachteten sie granuläres Nukleoprotein im Cytoplasma, jeweils in Kernnähe, in den ansonsten völlig gesund erscheinenden HEF-Zellen. Nach der Kokultivierung bildeten sich viele Syncytien, in denen sich - ultrahistologisch darstellbar - in perinukleären Zonen Nukleokapside angeordnet hatten. Wenige Stunden später ließen sich diese Filamente nahe der Zellperipherie lokalisieren und 12-16 h nach der Kokultivierung konnte "budding" von Viruspartikeln nachgewiesen werden. Die Untersucher vermuten, daß die Kokultivierung die Reifung des Nukleoproteins dazu aktiviert, von der perinukleären Zone zum Zellrand zu wandern.

2.5.2. SSPE-Virus

KATZ et al. (1969) kultivierten Gehirngewebe von SSPE-Patienten und untersuchten die Zellen ultrahistologisch. Sie beschrieben viele Filamente in Kernen von Nervenzellen, fanden aber keine Anzeichen des Austritts von Partikeln aus der Zelle. Im Kern solcher Zellen ließen sich häufig runde, mit elektronendichtem Material gefüllte Körperchen nachweisen (nuclear bodies), die von einer fibrillären Hülle umgeben waren (OYANAGI et al., 1970). Bei längerer Bebrütung trat im Kern, auch in Syncytien, Nukleoprotein eindeutig tubulärer Struktur auf. Die Stränge hatten einen inneren Durchmesser von 5-7 nm und einen äußeren von 15-17 nm. Im Cytoplasma waren neben gleichen Strukturen auch granuläre Filamente anzutreffen, die Nukleokapsidsträngen sehr ähnlich sind. Ihr Durchmesser von 20-25 nm übertraf jedoch den der Morbillivirus-typischen Stränge. Diese granulären Filamente namen große Bereiche des Cytoplasmas ein und waren immer in denjenigen Zellen enthalten, die auch typisches Nukleoprotein besaßen. OYANAGI et al. (1970) beobachteten ausschließlich unveränderte Zellmembranen und konnten weder von "budding" noch von freigesetzten Viruspartikeln berichten.

In Ultradünnschnitten von Hirnbiopsie-Material dreier SSPE-Patienten (JAC, ROB, DUN) fanden OYANAGI et al. (1971a) drei Typen dieser beschriebenen "nuclear bodies", die in der Größe von Fall zu Fall sehr unterschiedlich waren. Sie stellten fest, daß "nuclear bodies" immer bei SSPE-Infektionen auftreten, aber nicht typisch für sie sind, da sie auch bei anderen pathologischen Prozessen - nicht unbedingt viralen Ursprungs - vorhanden sind. Neben diesen "nuclear bodies" enthielten die Zellen große Ansammlungen von Nukleokapsiden, die oft den gesamten Kern einnehmen

und dessen Stränge bis zu 3000 nm Länge aufwiesen. Im Cytoplasma dieser Biopsie-Zellen waren ferner häufig auch granuläre Filamente mit einem Durchmesser von 20-25 nm anzutreffen. In ähnlichen Untersuchungen von MARTINEZ et al. (1974) an acht SSPE-Patienten hatten die "nuclear bodies" stets ein anderes Aussehen. Die Autoren unterschieden zwei große Gruppen von "nuclear bodies", einfache und granuliert. Kernfilamente dieser Zellen hatten einen geringeren Durchmesser als die Plasmafilamente, die bis zu 25 nm breit sein konnten.

OYANAGI et al. (1971b) haben ferner in ultrahistologischen Untersuchungen die Vermehrung von SSPE-Virus mit der des eng verwandten Masernvirus verglichen. Sie benutzten die Masernvirus-Stämme Edmonston und Woodfolk sowie die SSPE-Patientenisolate JAC und LEC. Als einheitliches Zellsystem dienten CV₁-Zellen. In mit SSPE-Virus infizierten Zellen beobachteten sie sehr große nukleäre Aggregate von filamentösen Strukturen, die häufig den gesamten Kern einnahmen, den Raum direkt an der Kernmembran und um den Nukleolus jedoch aussparten. Nicht selten waren in manchen Kernen nur kleinere Bezirke mit parallel angeordneten Filamenten zu finden, deren äußerer und innerer Durchmesser 15-17 nm bzw. 5-7 nm betrug. Die Autoren sprachen sie als glatte Filamente (smooth filaments) an, während sie die im Cytoplasma auftretenden als granulierten Filamente (granular filaments) bezeichneten. Die Oberfläche der granulierten Filamente erschien im elektronenoptischen Kontrast aufgeraut, wodurch wahrscheinlich der äußere Durchmesser von 22-25 nm entsteht. Sie kommen ausschließlich im Cytoplasma vor, liegen nie parallel zueinander und vereinen sich häufig mit den Ribosomen oder dem rauen endoplasmatischen Retikulum. Die cytoplasmatischen, granulierten Filamente sind nur in der perinukleären Zone nie direkt an der Zellmembran beschrieben worden. Letztere machte stellenweise einen gewellten Eindruck. Häufig lagen vor der Zellmembran runde, pleomorphe Partikel mit einem Durchmesser von 150-

250 nm, die aber weder Nukleokapside enthielten noch an der Außenseite Projektionen trugen. Im Gegensatz dazu wurden aus den Masernvirus-infizierten CV₁-Zellen Partikel freigesetzt, die alle Attribute eines kompletten Paramyxovirus aufwiesen. Hier lagen die Plasmafilamente vor allem in der Nähe der Plasmamembran, um sich dann zur Virusreifung symmetrisch an ihr anzulagern.

Wie beim Masernvirus hat man auch beim SSPE-Virus produktive wie auch persistent infizierte nicht-produktive Viruszellsysteme nachgewiesen. DUBOIS-DALCQ et al. (1974) haben die Vermehrungsstufen in solchen Systemen an HeLa- und Vero-Zellen studiert. In den persistent infizierten Zellen fanden sich große Mengen von diffus im Cytoplasma verteilten glatten Filamenten, während sich die produktive Infektion durch umschriebene Bezirke mit granulären Filamenten auszeichnete. Bei beiden Verlaufsformen werden Riesenzellen mit "nuclear bodies" ausgebildet, die Zellmembran ist jedoch bei der nicht-produktiven Infektion unverändert (BROWN und THORMAR, 1976). Im Verlauf einer produktiven SSPE-Infektion lagerten sich die Nukleokapside an die alterierten Zellmembranabschnitte an, die sich dann tropfenförmig ausstülpten und an der Basis abschnürten. Durch solche für die Paramyxoviren typische Budding-Prozesse werden reife Viruspartikel gebildet, die ein Nukleokapsid enthalten und auf der Hülle Spikes tragen. Da bei persistenten Infektionen nie komplette Viruspartikel gefunden wurden, die Zellinfektion jedoch weitergetragen wird, vermuten IWASAKI und KOPROWSKI (1974), daß hier ausschließlich unbehüllte Nukleokapside von einer Zelle zur anderen geschleust werden. Der ultrahistologische Nachweis für diesen Mechanismus jedoch steht noch aus.

2.5.3. Staupevirus

Anhand der Ergebnisse aus ultrahistologischen Untersuchungen über die Vermehrung von Staupeviren in einer Kultur aus Cerebellum-Zellen von Hunden unterschieden KOESTNER und LONG (1970) drei Phasen:

1. Phase: In den intraplasmatischen Einschlusskörperchen entsprechender Zellzonen befinden sich kleinere und größere Aggregate mit röhrenartigen Strukturen, den wahrscheinlichen Nukleoproteinsträngen, die sich zwar in deutlich von Cytoplasma abgegrenzten Bezirken aufhalten, aber nicht von einer Membran umgeben sind. Die Länge der Stränge ist an einigen Stellen meßbar und liegt zwischen 1500 und 3200 nm.
2. Phase: Der Kern ist ebenfalls verändert und enthält die gleichen Nukleoproteinstrukturen wie das Cytoplasma. Oft ist der Kern vollständig mit solchen Filamenten ausgefüllt. In einem etwas späteren Stadium der Infektion lagern sich diese Filamente parallel zueinander.
3. Phase: Die an vielen Stellen verdichtete Zellmembran wird innen von Nukleokapsidmaterial gesäumt und trägt stellenweise auf ihrer Außenwand kleine Projektionen. Hier wölbt sie sich später vor und entläßt per Abschürung freie Viruspartikel.

Da die Virussyntese und -reifung in der Regel ein kontinuierlicher Prozess ist, können in einer Zelle gleichzeitig Nukleokapsidansammlungen, an der Zellmembran symmetrisch angelagerte Nukleokapside und knospende Viruspartikel gefunden werden. CORNWELL et al. (1971) beobachteten in Hunde-

nierenzellen die Vermehrung von Staupeviren. Dabei fiel ihnen auf, daß sich die Nukleokapsidstränge in einem fortgeschrittenen Stadium der Infektion häufig in mehreren Reihen an die Zellmembran anlagern, bevor es zum budding und zur Freisetzung des Virus aus der Zelle kommt. Die extrazellulären Partikel hatten Durchmesser von 180-370 nm.

Unterschiede zwischen verschiedenen Staupe-Virus-Stämmen bezüglich der zellulären Vermehrungsprozesse vermuteten CONFER et al. (1975). Sie untersuchten drei Staupevirus-Stämme ultrahistologisch in Vero-Zellen. Bei einem Stamm lag das Nukleoprotein diffus verteilt im Cytoplasma, während beim anderen Stamm umschriebene Bezirke gebildet wurden. Der dritte Stamm ließ sehr wenig Filamente in der Zelle erkennen. Kernveränderungen in Form von Nukleoproteinanhäufungen lösten nur zwei der drei Stämme aus.

2.5.4. Rinderpest-Virus

BREESE und DE BOER (1963) haben Ultradünnschnitte von BK-Zellen (bovine Nieren) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit Rinderpest-Virus angefertigt und untersucht. 3 h nach der Infektion war mikroskopisch die Bildung erster Riesenzellen zu beobachten, 24 h später fanden sie ultrahistologisch Anhaltspunkte für virale Reifungsprozesse in den Mitochondrien und beschrieben Partikel im Cytoplasma mit einem Durchmesser von 150-300 nm, die sie für Rinderpest-Viren hielten. Jedoch fanden sie in keinem Schnitt Ausschleusungsvorgänge für reife Viruspartikel.

In einer anderen Studie gleicher Art wurden an Kälbernierenzellen mit cytoplasmatischen Einschlusskörperchen ultrahistologisch festgestellt, daß die einen meistens parallel gelagerten Filamente mit innerem und äußerem Durchmesser von 7 bzw. 20 nm, die anderen kompakte Ansammlungen von feinem granulärem und fibrillärem Material enthielten. Diese Ansammlungen waren so dicht geknäuelte, daß es schwierig war,

in ihnen Filamente zu erkennen (TAJIMA et al., 1967).
In diesen Untersuchungen konnten weder Viruspartikel
in der Zelle noch beim Verlassen der Zelle gefunden
werden.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Virus

Das verwendete Virus PMV 107 wurde von BACHMANN et al. (1975) beschrieben. Es stammte aus dem Gehirn einer 15 Monate alten Färsen, bei der die Symptome einer sporadischen Encephalomyelitis aufgetreten waren. Die Isolierung erfolgte durch Explantierung von Gehirnstückchen und Cokultivierung mit verschiedenen, nicht infizierten Zellkulturen. Seit der Isolierung war das PMV 107 durch ständige Cokultivierung sowohl in CV₁-Zellen als auch in fötalen Kälberlungenzellen gehalten worden.

3.1.2. Zellkulturen

Als Vermehrungssysteme für das PMV 107 wurden die Affennierenzelllinie CV₁, (ATCC, CCL 70) sowie sekundäre fötale Kälberlungenzellen (BEL) verwendet.

Die CV₁-Zellen stammen vom Wistar-Institut, Philadelphia, USA. Als Medium diente Minimal Essential Medium (MEM) mit Earle'scher Salzlösung (EAGLE, 1959), dem 5% fötales Kälberserum zugesetzt wurde.

Die zur Herstellung der fötalen Kälberlungenzellen benötigten 3-5 Monate alten Föten kamen vom Schlachthof München. Nach steriler Entnahme der Föten wurde die Lunge in kleine Stücke geschnitten und nach zweimaligem Waschen in PBS (phosphate buffered saline) nach Standardmethoden tryptsinisiert (MAYR et al., 1974). Die Herstellung von Sekundärzellkulturen erfolgte aus dichtgewachsenen primären Einschichtzellkulturen unter Verwendung von STV (saline-trypsin-versene, MARCUS et al., 1956). Als Medium diente je-

weils Minimal Essential Medium mit Earle'scher Salzlösung unter Zusatz von 5% fötalem Kälberserum und 0,5% Laktalbuminhydrolysat.

Alle Zellkulturmedien enthielten ferner 100 IE/ml Penicillin und 100 γ /ml Streptomycinsulfat.

3.1.3. Infektion der Zellkulturen

Kälberlungenzellkulturen:

Methode 1: Dichte, sekundäre Einschichtzellkulturen wurden nach Abgießen des Mediums einmal mit PBS gewaschen und dann mit 2 ml (Vierkantflaschen) bis 5 ml (Rouxschalen) PMV 107-haltigem Medium beschickt, das einen Infektiositätstiter von etwa $10^{4,5}$ bis $10^{5,5}$ KID₅₀/ml aufwies. Die Virusadsorption wurde über 60 Minuten bei 37°C vorgenommen. Anschließend erfolgte die Zugabe von Erhaltungsmedium und Bebrütung bei 37°C.

Methode 2: Die zweite Möglichkeit der Zellinfektion stellt die Cokultivierungsmethode dar, wobei 2 Teile frisch trypsinierte BEL-Zellen mit einem Teil infizierter BEL-Zellen suspendiert und anschließend in Vierkantflaschen ausgesät werden.

CV₁-Zellkulturen:

Die Infektion der CV₁-Zellen erfolgte stets durch Cokultivierung mit persistent infizierten PMV 107-CV₁-Zellen. Die infizierten Zellen wurden dann regelmäßig alle 3-5 Tage im Verhältnis 1:2 geteilt. Je nach Degenerationsstadium der infizierten CV₁-Zellkulturen wurden alle 3-6 Wochen nicht-infizierte CV₁-Zellen diesem System zugegeben.

3.1.4. Zellgewinnung und Einbettung

24,48,72 und 96 h nach der Infektion wurde jeweils eine Vierkantflasche zur Weiterverarbeitung für die Ultrahistologie entnommen. Nach Abgießen des Mediums und Abspülen mit PBS oder Earle'scher Lösung erfolgten die Ablösung der Zellen mit einem sterilem Gummischaber (rubber policeman) von der Glasunterlage, Abspülen mit PBS in ein Zentrifugenglas und Sedimentation bei 600 g über 5 Minuten lang. Das gewonnene Zellpellet wurde 5 Minuten in 1%iger Glutaraldehydlösung und etwa 30 Minuten in 2%igem Osmiumtetroxid fixiert, worauf die Entwässerung in der Alkoholreihe folgte.

Zur Einbettung wurde das Zellpellet mit scharfer Klinge in Stückchen von 1-2mm Kantenlänge zerteilt und mit Durcupan (Fa. Fluka) in Gelatinekapseln gefüllt. Die so präparierten Kapseln wurden für 2-3 Tage bei 60°C zum Polymerisieren des Kunstharzes im Wärmeschrank aufbewahrt.

3.1.5. Ultrahistologie

Zur Herstellung der Ultradünnschnitte diente eine LKB Ultratome Typ 4802 a. Nach Anfertigung der 300-500 A dicken Schnitte wurden sie auf Formvar-beschichtete Kupfernetze aufgenommen und nach REYNOLDS (1963) mit Uranylacetat und Bleicitrat doppelkontrastiert.

Die Durchmusterung der Schnitte erfolgte in einem Siemens-Elmiskop bei einer Spannung von 80 000 Volt und Instrumentenvergrößerungen zwischen 10 000- und 40 000-fach.

3.2. Versuche und Ergebnisse

Die ultrahistologischen Untersuchungen wurden vergleichend an zwei unterschiedlichen Zellsystemen durchgeführt, an infizierten CV₁- und an BEL-Zellen.

Die Entnahme der Kulturzellen für die Einbettung richtete sich in erster Linie nach der Ausbildung von Riesenzellen, die sich lichtoptisch nachweisen ließen, aber auch nach dem Auftreten des extrazellulären PMV-107 im Medium der infizierten Kulturen.

Die Riesenzellbildung begann in CV₁- wie in BEL-Kulturen am 1. Tag p.inf. und erreichte am 3.-4. Tag p.inf. ihren Höhepunkt. Der gleiche zeitliche Ablauf wurde für die Freisetzung von Viruspartikeln aus der Zelle ins Medium ermittelt. Mit der Immunfluoreszenzmethode ließ sich ferner nachweisen, daß 80-90% der CV₁- und BEL-Zellen am Höhepunkt des cytopathischen Effektes (Riesenzellbildung) mit PMV-107 infiziert waren.

Die Infektiosität des Kulturmediums von infizierten BEL-Zellen war am 1. Tag p.inf. noch sehr gering. Bis zum 4. Tag p.inf. stieg sie auf Werte um $10^{5,5}$ KID₅₀ pro ml an, um dann wieder abzusinken. Gegenüber dieser deutlich produktiven Virusvermehrung unterscheiden sich die infizierten CV₁-Kulturen. Sie bildeten ab dem 1. Tag p.inf. kontinuierlich zellfreie Viruspartikel in großen Mengen, die morphologisch intakt erschienen (PFEIL, 1975). Die Infektiosität in diesen zellfreien Kulturüberständen war jedoch gering. Sie lag ständig bei $< 10^1$ KID₅₀ pro ml Medium.

Dieses unterschiedliche Verhalten des PMV-107 in BEL-Zellen einerseits und CV₁-Zellen andererseits war beim ultrahistologischen Vergleich der Synthesevorgänge von besonderem Interesse.

3.2.1. Vermehrung in BEL-Zellen

In Dünnschnitten von PMV-107-infizierten am 1. oder 2. Bebrütungstag eingebetteten BEL-Zellen, die im Lichtmikroskop nur einen sehr schwachen CPE aufwiesen, ließen sich weder im Zellkern noch im Cytoplasma oder an der Plasmamembran, im Vergleich zu Präparaten aus nicht infizierten Zellen, morphologische Veränderungen feststellen, die auf virale Synthesevorgänge hinwiesen.

In BEL-Zellmaterial vom 3. oder 4. Bebrütungstag, also zum Zeitpunkt der maximalen CPE-Ausbildung und Virusfreisetzung eingebettet, geschnitten und kontrastiert, wurden im Cytoplasma zum Teil große Ansammlungen von elektronendichtem tubulären Material beobachtet (Abb. 1). Die Tubuli besaßen einen äußeren Durchmesser von 17-18 nm. An ihrer Außenseite erschienen die Tubuli stark aufgerauht; auffällig war ihre starre, langgestreckte, teilweise parallele Lagerung.

Die Lokalisierung der tubulären Gebilde innerhalb des Cytoplasmas variierte, in einigen Schnitten waren sie näher am Kern, in anderen näher an der Zellmembran gelagert.

Im Kern von BEL-Zellen ließen sich in einigen Schnitten abgegrenzte, ovale, von fibrillären Material umgebene Bezirke verschiedener Größe ausmachen, die mit geknäuelte gelagerten Filamenten gefüllt waren. Die Außenwand dieser Filamente war im Gegensatz zu der im Cytoplasma auftretenden glatt, der äußere Durchmesser betrug nur etwa 15 nm (Abb. 2 und 3). In anderen Schnitten hielten sich die Kernfilamente z.T. auch außerhalb der hier von granulärem Material umgebenen Bezirken auf. Das granuläre Material schien stellenweise durchbrochen zu sein (Abb. 4). Das Kernchromatin der entsprechenden Zellkerne war nicht über den gesamten Kern verteilt, sondern hauptsächlich am Kernrand gelagert (Kernwandhyperchromasie).

Virusausschleusungsprozesse an der Zellmembran waren selten und schwierig zu finden. In Abb. 5 ist eine stellenweise alterierte, verdickte, stark elektronendichte Zellmembran festgehalten, an deren Innenwand sich Nukleoprotein-Material angelagert hat, wie es dem alignment der Nukleokapside entspricht (A). Unterhalb der an die Zellmembran angelegten Nukleokapside befinden sich Bezirke mit gekräuselten tubulären Gebilden (B) (Abb. 5). Hier handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Nukleokapside, die sich der Kernmembran nähern.

Als Fortsetzung dieses alignment zeigen die Abbildungen 6, 7, 8 und 9 die stellenweise vorgewölbte Zellmembran (Pfeile), woraus nach ihrer Abschnürung an der Basis freie Viruspartikel entstehen (budding).

3.2.2. Vermehrung in CV₁-Zellen

Auch PMV 107-infizierte CV₁-Zellen, die nach 24h Bebrütungs-dauer eingebettet worden waren, zeigten im Vergleich zu den Kontrollschnitten keine Veränderungen, die auf virale Synthesevorgänge hinwiesen.

Virusspezifische Strukturen waren nur in solchen Zellen zu finden, die zu einem Zeitpunkt eingebettet worden waren, an dem mindestens 80% der Zellen PMV 107-Antigen enthielten. Dieses Stadium wurde mit der Immunofluoreszenzmethode festgestellt.

Zum Unterschied gegenüber BEL-Kulturzellen ließen sich trotz intensiver Durchmusterung von Schnitten in Kernen infizierter Zellen außer einer hochgradigen Kernrandhyperchromasie, keine Abweichungen von Kernen uninfizierter Zellen auffinden. Die Suche nach den in BEL-Zellen gefundenen Kernfilamenten verlief erfolglos.

Im Cytoplasma jedoch konnten ähnlich gestaltete Filamente wie in den BEL-Zellen ausgemacht werden. Auch hier waren die Filamente starr und langgestreckt und besaßen einen Durchmesser von 17-18 nm, was dem Nukleokapsiddurchmesser von Paramyxoviren entspricht (Abb. 10).

Im Cytoplasma dieser CV₁-Zellen ist ein großer Bezirk mit Filamenten sichtbar, die im Gegensatz zu den vorher beschriebenen stark geschlängelt und geknäuelte gelagert sind (Abb. 11). Der Durchmesser unterschied sich jedoch nicht von dem der starren Plasmafilamente. Die Außenwand der Plasmafilamente in CV₁-Zellen erschien abweichend zu den in BEL-Zellen gefundenen Filamenten glatt.

Auch in den CV₁-Zellen waren die Plasmafilamentansammlungen unterschiedlich lokalisiert, nämlich sowohl in Kernnähe als auch nahe der Zellmembran.

Mit besonderer Intensität wurden die zum Höhepunkt der Infektionsphase angelegten Schnitte nach Stadien der Virusreifung durchgemustert. In keinem der Schnitte durch PMV 107-infizierte CV₁-Zellen gelang es jedoch, elektronendichte, verdickte Zellmembranen, Anzeichen von "alignment" des Nukleoproteins oder "budding"-Prozesse zu finden.

Abbildung 1: Ultradünnschnitt durch eine BEL-Kulturzelle
3 Tage p.inf.
Große Ansammlung von aufgerauhten, auffällig
starr gelagerten Plasmafilamenten
C= Cytoplasma
F= Filamente
Vergrößerung: 60.000 fach

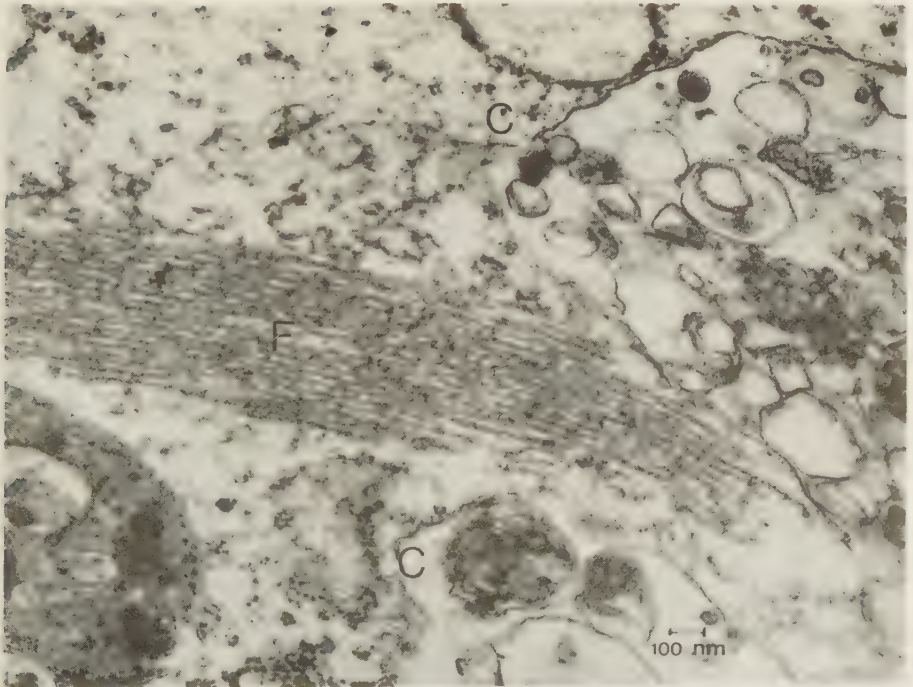


Abbildung 2: Ultradünnschnitt durch eine BEL-Kulturzelle
4 Tage p.inf.
Im Zellkern sind ovale, von fibrillärem Material umgebene Bezirke auszumachen, die mit geknäuelte gelagerten Filamenten gefüllt sind.
Kernwandhyperchromasie:
C= Cytoplasma
K= Kern
F= Kernfilamente
Vergrößerung: 30.000 fach

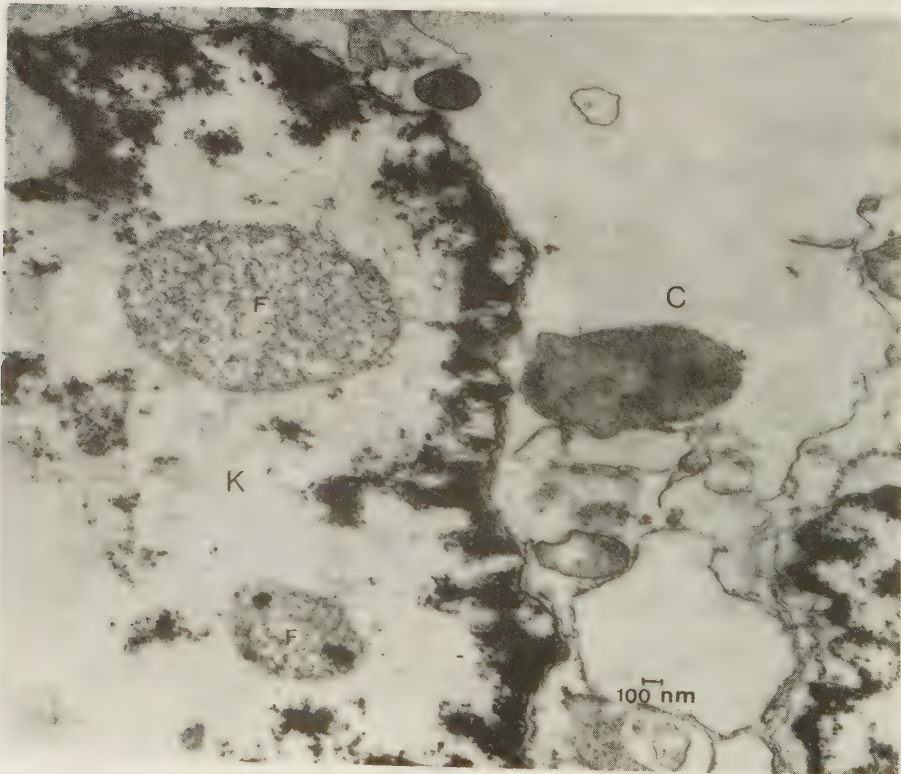


Abbildung 3: Ultradünnschnitt durch eine BEL-Kulturzelle
4 Tage p.inf.

Im Zellkern sind ovale, von fibrillärem Material umgebene Bezirke auszumachen, die mit geknäuelte gelagerten Filamenten gefüllt sind.
Kernwandhyperchromasie.

C= Cytoplasma

K= Kern

F= Kernfilamente

Vergrößerung: 40.000 fach

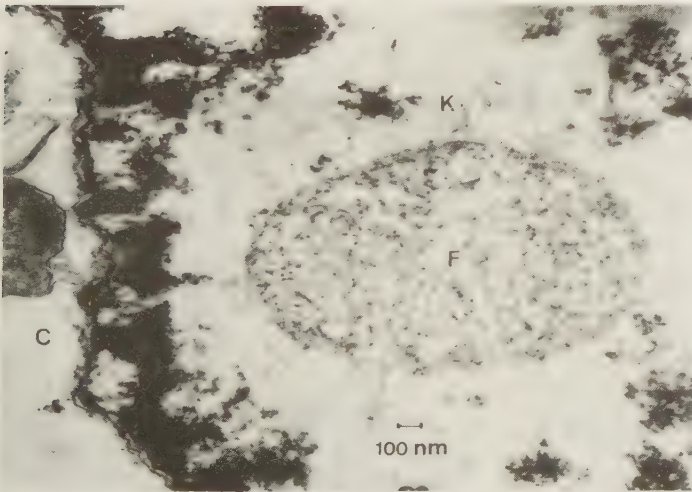


Abbildung 4: Ultradünnschnitt durch eine BEL-Kulturzelle
4 Tage p.inf.
Kernfilamente, die stellenweise von granulä-
rem Material umgeben sind.
Kernwandhyperchromasie.
C= Cytoplasma
K= Kern
F= Kernfilamente
Vergrößerung: 72.000

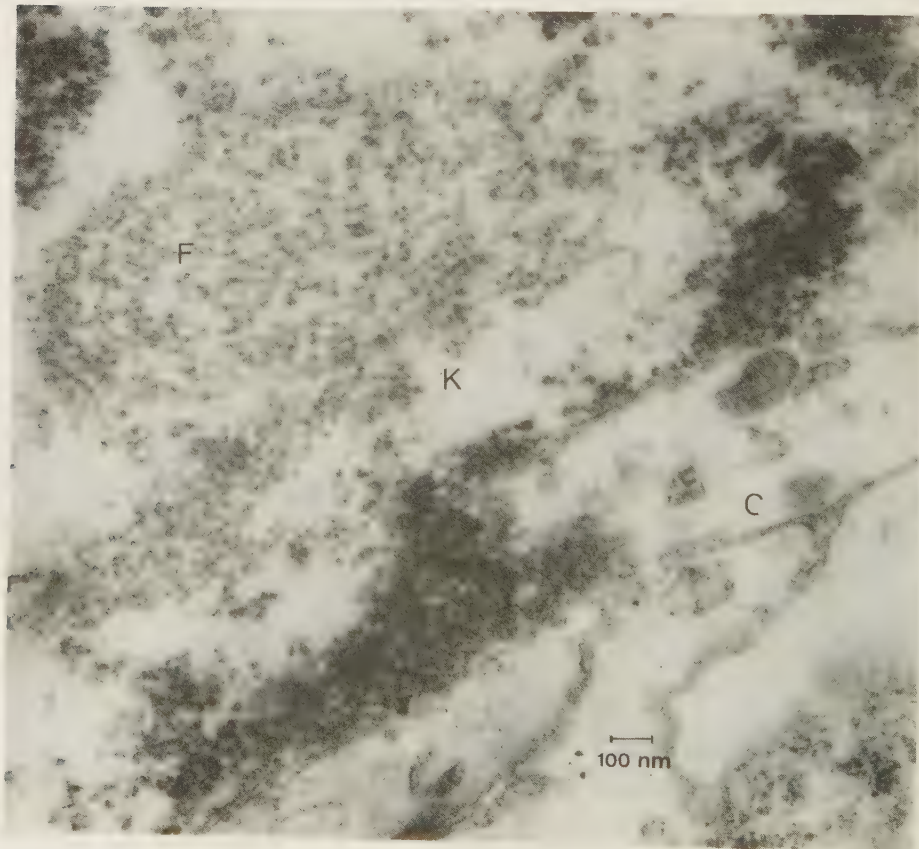


Abbildung 5: Ultradünnschnitt durch eine BEL-Kulturzelle

4 Tage p.inf.

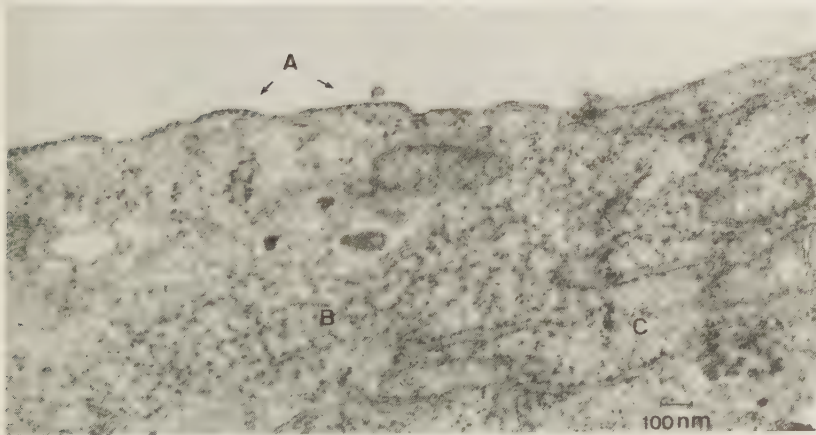
Stellenweise alterierte Zellmembran, an deren Innenwand sich Nukleokapside angelagert haben (alignment). Bezirke mit Nukleokapsiden im Cytoplasma.

C= Cytoplasma

A= alignment

B= Nukleokapsidansammlungen

Vergrößerung: 60.000 fach



Ausschnitt von Abb. 5

Vergrößerung: 140.000 fach

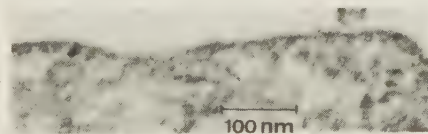


Abbildung 6: Ultradünnschnitt durch eine BEL-Kulturzelle
4 Tage p.inf.
Stellenweise alterierte, vorgewölbte Zellmembran (Pfeile). Nukleokapsidansammlungen im Cytoplasma.
C= Cytoplasma
K= Kern
B= Nukleokapside
Vergrößerung: 60.00 fach

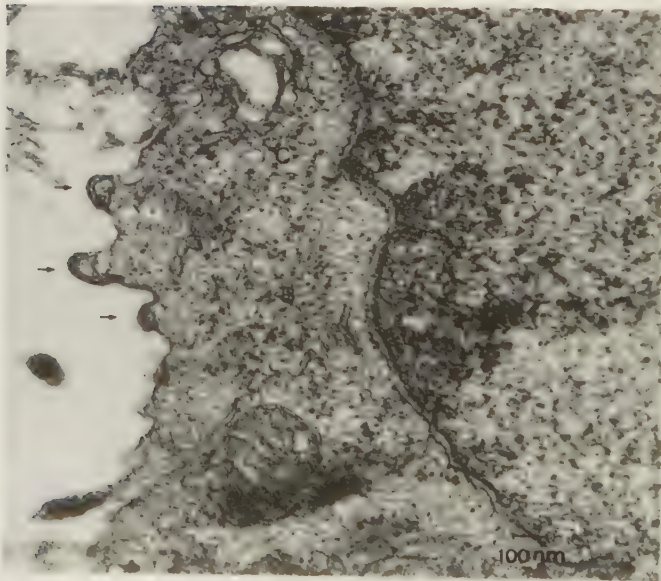


Abbildung 7: Ultradünnschnitt durch eine BEL-Kulturzelle
4 Tage p.inf.
Stellenweise alterierte, vorgewölbte Zellmem-
bran, beginnendes "budding" (Pfeile).
C= Cytoplasma
Vergrößerung: 72.000

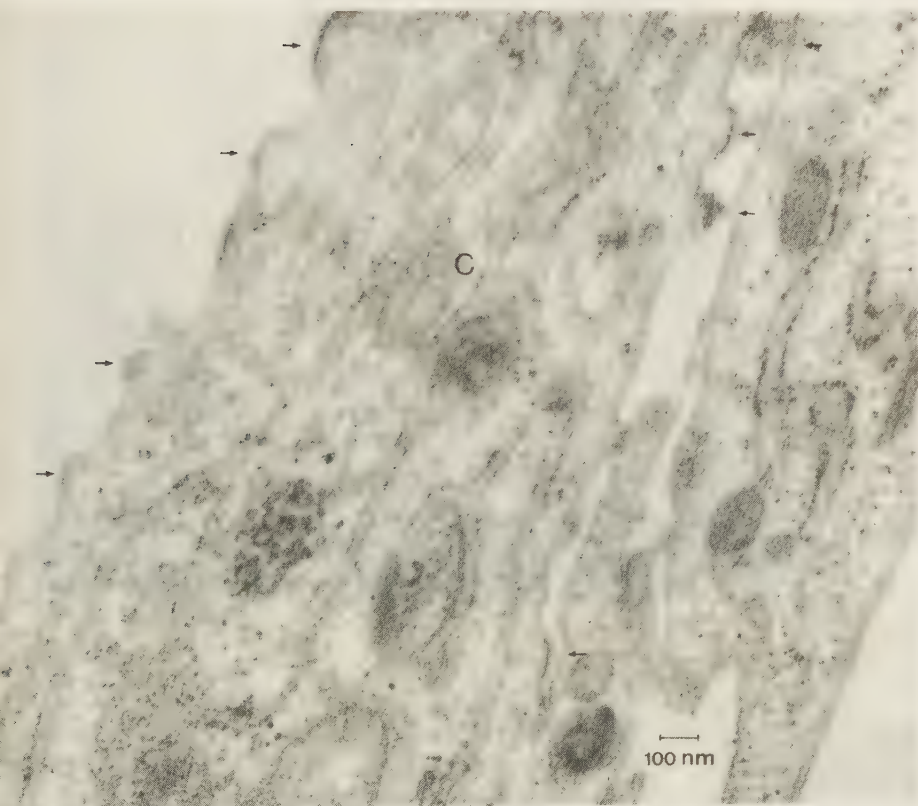


Abbildung 8: Ausschnitt aus Abb. 7
Vergrößerung: 72.000

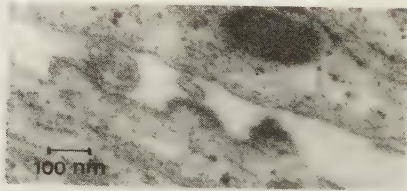


Abbildung 9: Ultradünnschnitt durch eine BEL-Kulturzelle
4 Tage p. inf.
"budding"-Prozesse
Vergrößerung 72.000

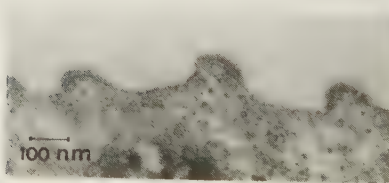


Abbildung 10: Ultradünnschnitt durch eine CV₁-Kulturzelle
4 Tage p.inf.
Starre, langgestreckte Nukleokapside mit
glatter Oberfläche im Cytoplasma.
C= Cytoplasma
Vergrößerung: 80.000

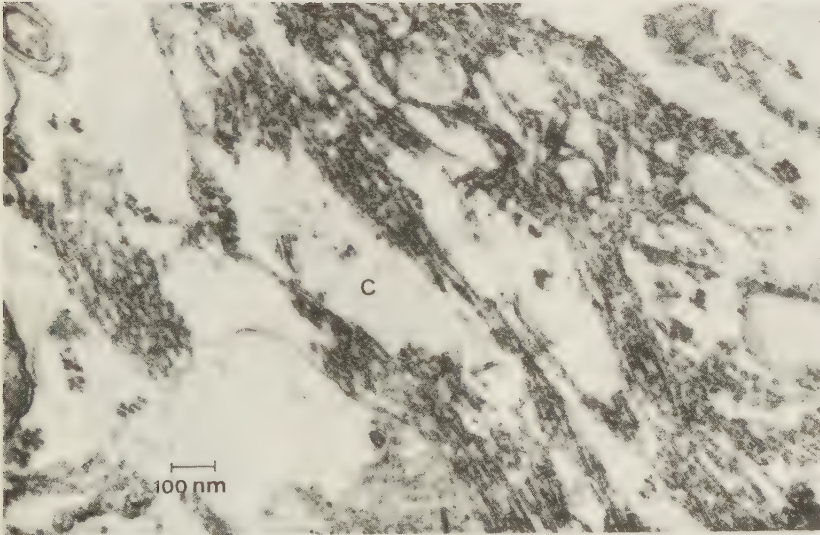
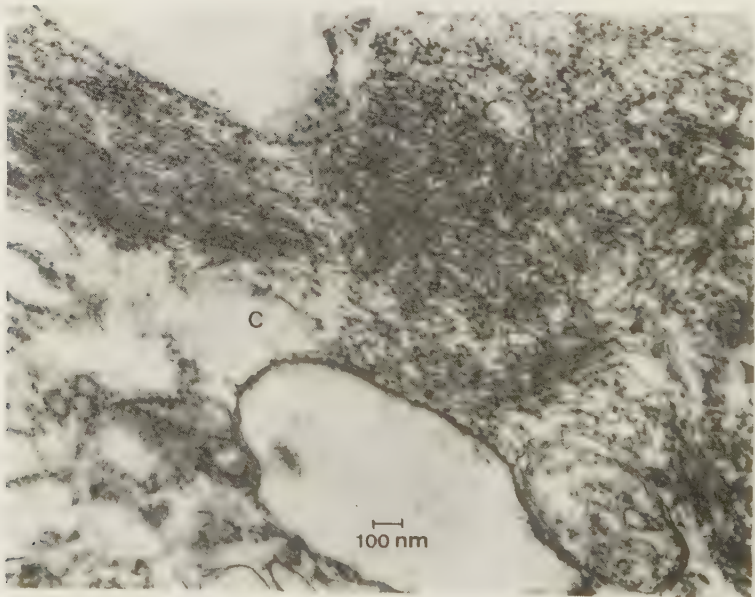


Abbildung 11: Ultradünnschnitt durch eine CV₁-Kulturzelle
4 Tage p. inf.

Große Ansammlung von Nukleokapsiden im Cytoplasma, die z.T. stark geschlängelt und geknäuelnt gelagert sind.

C= Cytoplasma

Vergrößerung 50.000



4. Besprechung der Ergebnisse

Der Nachweis von Nukleokapsiden in den Kernen von PMV 107-infizierten bovinen embryonalen Lungenzellen (BEL) stimmt mit ultrahistologischen Befunden überein, die für die Morbilliviren, Masernvirus (NAKAI et al., 1969) und SSPE-Virus (MARTINEZ et al., 1974) vorliegen. Die Lokalisation der Nukleokapside entspricht dabei den im Lichtmikroskop gefundenen, nukleären Einschlußkörperchen (NAKAI und IMAGAWA, 1969). Die Struktur der durch PMV 107-induzierten Kerneinschlüsse ist damit deutlich verschieden von den bei Parainfluenza 3-Virusinfektionen beschriebenen Einschlußkörperchen, bei denen nukleokapsidähnliche Filamente nicht auftreten. Nach Untersuchungen von RECZKO und BÜGEL (1962) enthalten die nukleären PI 3-Viruseinschlußkörperchen lediglich granuläres Material.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Filamente im Kern der PMV 107-infizierten BEL-Zellen sind wie die nukleären Strukturen bei SSPE-Virusinfektion zu sogenannten "nuclear bodies" organisiert (OYANAGI et al., 1970), die ähnlich den von NAKAI et al. (1969) beobachteten Masernvirusnukleokapsiden im Kern infizierter Affennierenzellen von einem fibrillären Saum umgeben sind. Bei PMV 107 ließen sich darüberhinaus auch "nuclear bodies" darstellen, bei denen der Fibrillenmantel fehlte (Abb. 4). Derartige "nuclear bodies" sind bei Zellen, die mit Staupevirus oder Rinderpestvirus infiziert sind, nicht gefunden worden.

Die PMV 107-Nukleokapside waren nie über den gesamten Kern einer infizierten Zelle verteilt, wie dies von KOESTNER und LONG (1970) bei einem Staupevirusstamm beschrieben wurde. Diese Ergebnisse sind jedoch bisher nicht bestätigt worden. Filamente scheinen im Kern bei der Vermehrung von Staupevirus nicht immer vorzukommen. CORNWELL et al. (1971) vermuten Stammunterschiede. Die Staupevirusfilamente, die im

Kern auftreten können, besitzen gleiche Struktur und Größe, wie die Cytoplasmafilamente. Bei Masern-, SSPE- und P 107-Virus sind dagegen die Kernfilamente mit einem Durchmesser von 15 nm etwas kleiner, als der der Filamente im Plasma (17-18 nm).

Eine bei den Morbilliviren bisher nicht beschriebene Veränderung ist die bei dem PMV 107 beobachtete starke Kernwandhyperchromasie.

Die im Cytoplasma der infizierten BEL-Zellen auftretenden filamentösen Nukleokapside stimmen in ihrer Größe mit denen der Morbilliviren überein. Die aufgerauhte äußere Wand erinnert stark an die von DUBOIS-DALCQ et al. (1974) erstmals beobachteten "rough filaments". Diese Formen kommen hauptsächlich bei produktiven SSPE-Virusinfektionen vor. Im Einklang hiermit steht die Beobachtung, daß die Vermehrung von PMV 107 in BEL-Zellen ebenfalls vorwiegend produktiv verläuft (PFEIL, 1975).

Ähnlich wie bei produktiven Masern- und SSPE-Virusinfektionen kommt es nach "alignment" und "budding" ferner zur Ausschleusung von Partikeln, die infektiös sind (NAKAI et al., 1969; DUBOIS-DALCQ et al., 1974).

In CV₁-Zellkulturen verlief die Vermehrung des PMV 107 abweichend, was vermutlich damit zusammenhängt, daß es sich in diesem Zellsystem um eine nichtproduktive Infektion handelt, d.h. es werden kaum infektiöse Partikel gebildet (PFEIL, 1975). Ausschleusungsvorgänge müssen jedoch stattfinden, da im Überstand und ultrahistologisch zwischen Zellmembranen morphologisch intakt erscheinende Viruspartikel nachgewiesen werden können (BACHMANN et al., 1975; BACHMANN unveröff. Ergebnisse).

In der vorliegenden Arbeit konnte im Kern infizierter CV₁-Zellen lediglich eine Kernwandhyperchromasie beobachtet werden. "Nuclear bodies" oder frei im Kern liegende Filamente

ließen sich trotz intensiver Suche nicht darstellen. Aus diesem Befund ergibt sich ein Widerspruch, da lichtmikroskopische Untersuchungen gezeigt haben, daß auch in diesem Zellsystem kleine nukleäre Einschlußkörperchen bei der Vermehrung des PMV 107 vorkommen und Virusantigen auch mit Hilfe der Immunofluoreszenz im Kern nachgewiesen werden konnte (BACHMANN et al., 1975).

Eine Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnte in der Persistenz des PMV 107 in den CV₁-Zellen liegen, wobei außer vereinzelt Riesenzellen keine weiteren cytopathischen Veränderungen auftreten, obwohl eine große Zahl von Zellen infiziert ist. Auch "budding" oder "alignment" ließ sich - im Gegensatz zu früheren Ergebnissen (BACHMANN et al., 1975) - in den vorliegenden Untersuchungen nicht mit Sicherheit nachweisen. Da morphologisch intakte, jedoch nichtinfektiöse Viruspartikel im Überstand von PMV 107-infizierten CV₁-Zellen vorkommen, müssen derartige Prozesse stattfinden. Möglicherweise sind hier die quantitativen Verhältnisse dafür verantwortlich zu machen, daß nicht genügend Partikel zum Zeitpunkt der Einbettung und Untersuchung des Materials zur Ausschleusung kamen, um sie ultra-histologisch auszumachen. Da mit zunehmender Passagezahl der persistent infizierten CV₁-Zellkulturen der Prozentsatz der lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderungen in Intervallen zyklisch zu- und abnimmt (BACHMANN, unveröff. Ergebnisse), könnten im Vergleich zu den früheren Untersuchungen, bei denen "alignment" beobachtet wurde (BACHMANN et al., 1975) in höheren Zellpassagen andere Verhältnisse vorherrschen. Für eine solche Hypothese sprechen Befunde die mit Hilfe der Gefrierätztechnik bei infizierten CV₁-Zellen erzielt wurden, bei denen der Nachweis von "budding" auf der Zellmembran ebenfalls nicht gelang (DUBOIS-DALCQ pers. Mitteilung 1976).

In Übereinstimmung mit persistierenden, nichtproduktiven Infektionen bei Masern- und SSPE-Virus (DUBOIS-DALCQ et al.,

1974; MENNA et al., 1975) wiesen die bei PMV 107-infizierten CV₁-Zellen im Cytoplasma gefundenen Nukleokapside eine glatte Oberfläche auf ("smooth filaments"). Das ausschließliche Vorkommen dieser Nukleokapsidfilamente im Cytoplasma bei PMV 107 steht trotz der diskutierten Widersprüche zu den lichtmikroskopischen Befunden in Übereinstimmung mit Ergebnissen bei anderen persistierenden Morbillivirusinfektionen. Auch HENEEN et al. (1973) sowie MENNA et al. (1975) stellten bei ultrahistologischen Untersuchungen von persistent mit Masernvirus infizierten Zellen fest, daß Nukleokapside nur im Cytoplasma nachweisbar waren.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen auf große Ähnlichkeiten der ultrahistologischen Vermehrungsvorgänge des PMV 107 mit den Morbilliviren hin. Danach scheint das PMV 107 im wesentlichen Syntheseschritte zu durchlaufen, wie sie auch bei Masern- und SSPE-Viren beschrieben worden sind. Weniger starke Analogien bestehen zur Vermehrung von Staupe- und Rinderpestviren in Zellkulturen. Unterschiede zwischen einzelnen Virusarten des Genus Morbillivirus scheinen möglicherweise mit der Art des gewählten Zellsystems zusammenzuhängen oder vom verwendeten Virusstamm abzuhängen. Befunde von CORNWELL et al. (1971) und KNIGHT et al. (1974) bei Morbilliviren sowie von COMPANS et al. (1966) bei den Parainfluenzaviren bestätigen diese Schlußfolgerungen.

5. Zusammenfassung

Die Vermehrung des Paramyxovirus 107 (PMV 107) wurde in zwei verschiedenen Zellsystemen mit Hilfe der Ultrahistologie untersucht. In bovinen embryonalen Lungenzellkulturen (BEL), in denen sich das Virus produktiv vermehrt, ließen sich sowohl im Kern als auch im Cytoplasma Nukleokapside (NC) nachweisen. Die NC im Kern hatten einen Durchmesser von 15 nm und waren zu "nuclear bodies" organisiert, die teilweise von Fibrillen umsäumt waren. Im Cytoplasma vorkommende NC hatten einen Durchmesser von 17-18 nm und wiesen eine raue Oberfläche auf ("rough filaments"). Weiterhin wurden "alignment" und "budding" in diesem Zellsystem nach PMV 107-Infektion beobachtet.

Dagegen konnten bei persistent mit PMV 107-infizierten CV₁-Zellen (Affennierenzelllinie) Nukleokapsidstrukturen nur im Cytoplasma festgestellt werden. Sie hatten einen Durchmesser von 17-18 nm und eine glatte Oberfläche ("smooth filaments"), ähnlich wie bei nichtproduktiven Infektionen von Masern- und SSPE-Virus. Ausschleusungsprozesse waren in diesen Zellen nicht nachweisbar.

Die vorliegenden Befunde weisen auf eine Analogie der Vermehrungsvorgänge von PMV 107 zum Masern- und SSPE-Virus hin. Nach kritischem Vergleich der Ergebnisse mit Veröffentlichungen von ultrahistologischen Untersuchungen über die Vermehrung von Masern-, SSPE-, Staupe- und Rinderpestvirus scheint eine Einordnung des PMV 107 in das Genus Morbillivirus innerhalb der Familie Paramyxoviridae gerechtfertigt.

Abstract

Ultrahistological studies on the Replication of Paramyxovirus-107 (PMV 107) in Monkey-Kidney and Bovine Embryonic Lung Cell-Cultures.

The replication of paramyxovirus 107 (PMV 107) was investigated in two different cell systems by means of ultrahistology. Nucleocapsids (NC) could be demonstrated in the nucleus and the cytoplasm of bovine embryonic lung cell cultures (BEL), where the virus replicates productively. The NC in the nucleus had a size of 15 nm and were organized as "nuclear bodies", which were partly surrounded by fibrillar material. The cytoplasmic NC had a size of 17-18 nm and showed a rough surface ("rough filaments"). In addition "alignment" and "budding" were observed in this cell system after PMV 107-infection.

On the other hand NC could only be demonstrated in the cytoplasm of PMV 107 persistently infected CV₁ cells (monkey kidney cell line). The size of the NC was 17-18 nm with a smooth surface ("smooth filaments") similar to non-productive infections found with measles and SSPE virus. Virus release processes could not be demonstrated.

These results indicate an analogy of replication steps of PMV 107 to measles and SSPE virus. Critical comparison of results with publications of ultrahistological investigations on the replication of measles, SSPE, distemper and rinderpest viruses allows a classification of PMV 107 into the genus morbillivirus within the paramyxoviridae family.

6. Literaturverzeichnis

- ANDREWES, C.H., F.B. BANG and F.M. BURNET, 1955: A short description of the myxovirus group (influenza and related viruses).
Virology 1, 176.
- ANISIMOVA, E., I. MARES and F. KYNCL, 1968: Electron microscopic study of tissue culture cells infected with measles virus.
Acta Virol. 12, 289.
- APPEL, M.J.G. and J.H. GILLESPIE, 1972: Canine distemper virus.
Virology Mon. 11, 1.
- BACHMANN, P.A., V. TER MEULEN, G. JENTSCH, M. APPEL, Y. IWASAKI, R. MEYERMANN, H. KOPROWSKI and A. MAYR, 1975: Sporadic bovine meningo-encephalitis-isolation of a paramyxovirus.
Arch. Virol. 48, 107.
- BARBANTI-BRODANO, G., S. OYANAGI, M. KATZ and H. KOPROWSKI, 1970: Presence of two different viral agents in brain cells of patients with subacute sclerosing panencephalitis.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 134, 230.
- BINN, L.N., G.A. EDDY, E.C. LAZAR, J. HELMS and T. MURUANE, 1967: Viruses recovered from laboratory dogs with respiratory disease.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 126, 140.
- BODECHTEL, G. und E. GUTTMANN, 1931: Diffuse Encephalitis mit sklerosierender Entzündung des Hemisphärenmarkes.
Z. ges. Neurol. Psychiat. 133, 601.

- BOUTEILLE, M., C. FONTAINE, CL. VEDRENNE et J. DELARUE, 1965:
Sur un cas d'encéphalite subaiguë à inclusions.
Étude anatomoclinique et ultrastructurale.
Rev. neurol. 113, 454.
- BREESE, S.S. and C.J. DE BOER, 1963: Electron microscopy
of rinderpest virus in bovine kidney tissue
culture cells.
Virology 19, 340.
- BRODY, J.A. and R. DETELS, 1970: Subacute sclerosing pan-
encephalitis: a zoonosis following aberrant measles.
Lancet II, 500.
- BROWN, H.R. and H. THORMAR, 1976: Immunoperoxidase staining
of simple nuclear bodies in subacute sclerosing
panencephalitis (SSPE) by antiserum to measles
nucleocapsid.
Acta neuropath. 36, 259.
- CALIGUIRI, L.A., H.-D. KLENK and P.W. CHOPPIN, 1969: The
proteins of the parainfluenza-virus SV₅. I.
Separation of virion polypeptides by polyacryla-
mide-gel electrophoresis.
Virology 39, 460.
- CARTER, C., A. SCHLUEDERBERG and F.L. BLACK, 1973: Viral
RNA synthesis in measles virus infected cells.
Virology 53, 379.
- CHEN, C., R.W. COMPANS and P.W. CHOPPIN, 1971: Parainfluenza
virus surface projections glycoproteins with
hemagglutinin and neuraminidase activities.
J. gen. Virol. 11, 53.

6. Literaturverzeichnis

- ANDREWES, C.H., F.B. BANG and F.M. BURNET, 1955: A short description of the myxovirus group (influenza and related viruses).
Virology 1, 176.
- ANISIMOVA, E., I. MARES and F. KYNCL, 1968: Electron microscopic study of tissue culture cells infected with measles virus.
Acta Virol. 12, 289.
- APPEL, M.J.G. and J.H. GILLESPIE, 1972: Canine distemper virus.
Virology Mon. 11, 1.
- BACHMANN, P.A., V. TER MEULEN, G. JENTSCH, M. APPEL, Y. IWASAKI, R. MEYERMANN, H. KOPROWSKI and A. MAYR, 1975: Sporadic bovine meningo-encephalitis-isolation of a paramyxovirus.
Arch. Virol. 48, 107.
- BARBANTI-BRODANO, G., S. OYANAGI, M. KATZ and H. KOPROWSKI, 1970: Presence of two different viral agents in brain cells of patients with subacute sclerosing panencephalitis.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 134, 230.
- BINN, L.N., G.A. EDDY, E.C. LAZAR, J. HELMS and T. MURUANE, 1967: Viruses recovered from laboratory dogs with respiratory disease.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 126, 140.
- BODECHTEL, G. und E. GUTTMANN, 1931: Diffuse Encephalitis mit sklerosierender Entzündung des Hemisphärenmarkes.
Z. ges. Neurol. Psychiat. 133, 601.

- BOUTEILLE, M., C. FONTAINE, CL. VEDRENNE et J. DELARUE, 1965:
Sur un cas d'encéphalite subaiguë à inclusions.
Étude anatomoclinique et ultrastructurale.
Rev. neurol. 113, 454.
- BREESE, S.S. and C.J. DE BOER, 1963: Electron microscopy
of rinderpest virus in bovine kidney tissue
culture cells.
Virology 19, 340.
- BRODY, J.A. and R. DETELS, 1970: Subacute sclerosing pan-
encephalitis: a zoonosis following aberrant measles.
Lancet II, 500.
- BROWN, H.R. and H. THORMAR, 1976: Immunoperoxidase staining
of simple nuclear bodies in subacute sclerosing
panencephalitis (SSPE) by antiserum to measles
nucleocapsid.
Acta neuropath. 36, 259.
- CALIGUIRI, L.A., H.-D. KLENK and P.W. CHOPPIN, 1969: The
proteins of the parainfluenza-virus SV₅. I.
Separation of virion polypeptides by polyacryla-
mide-gel electrophoresis.
Virology 39, 460.
- CARTER, C., A. SCHLUEDERBERG and F.L. BLACK, 1973: Viral
RNA synthesis in measles virus infected cells.
Virology 53, 379.
- CHEN, C., R.W. COMPANS and P.W. CHOPPIN, 1971: Parainfluenza
virus surface projections glycoproteins with
hemagglutinin and neuraminidase activities.
J. gen. Virol. 11, 53.

CHOPPIN, P.W. and W. STOECKENIUS, 1964: The morphology of SV₅-virus.

Virology 23, 195

CHOPPIN, P.W., H.-D. KLENK, R.W. COMPANS and L.A. CALIGUIRI, 1971: The parainfluenza virus SV₅ and its relationship to the cell membrane.

Persp. Virol. 7, 127.

CHOPPIN, P.W. and R.W. COMPANS, 1975: Reproduction of paramyxoviruses.

In: Comprehensive virology. Vol. 4. Ed. by H. FRAENDEL-CONRAT and R.R. WAGNER, Plenum Press New York.

COMPANS, R.W., K.V. HOLMES, S. DALES and P.W. CHOPPIN, 1966: An electron microscopic study of moderate and virulent virus-cell interactions of the parainfluenza virus SV₅.

Virology 30, 411.

CONFER, A., D.E. KAHN, A. KOESTNER and S. KRAKOWKA, 1975: Comparison of canine distemper viral strains: an electron microscopic study.

Am. J. vet. Res. 36, 6.

CONNOLLY, J.H., I.V. ALLEN, L.J. HURWITZ and J. HD. MILLAR, 1967: Measles virus antibody and antigen in subacute sclerosing panencephalitis.

Lancet I, 542.

CORNWELL, H.J.C., H.M. LAIRD, N.G. WRIGHT and H. THOMPSON, 1971: Ultrastructural features of canine distemper virus infection in a dog kidney cell line.

J. gen. Virol. 12, 281.

- DOI, Y., T. SANPE, M. NAKAJIMA, S. OKAWA, T. KATOH, H. ITOH,
T. SATO, K. OGUCHI, T. KUMANISHI and T. TSUBAKI,
1972: Properties of a cytopathic agent isolated
from a patient with subacute sclerosing panence-
phalitis in Japan.
Jap. J. Med. Sci. Biol. 25, 321.
- DUBOIS-DALCO, M., L.H. BARBOSA, R. HAMILTON and J.S. SEVER,
1974: Comparison between productive and latent
subacute sclerosing panencephalitis, viral infection
in vitro.
Lab. Invest. 30, 241.
- DUESBERG, P.H. and W.S. ROBINSON, 1965: Isolation of the
nucleic acid of Newcastle disease virus (NDV).
Proc. nat. Acad. Sci. 54, 794.
- EAGLE, H., 1959: Amino acid metabolism in mammalian cell
cultures.
Science 130, 432.
- EAST, J.L. and D.W. KINGSBURY, 1971: Mumps virus replication
in chick embryo lung cells: properties of RNA
species in virions and infected cells.
J. Virol. 8, 161.
- FENNER, F., 1976: The classification and nomenclature of
viruses.
J. gen. Virol. 31, 463.
- FREEMAN, J.M., R.L. MAGOFFIN, E.H. LENNETTE and R.M. HERNDON,
1967: Additional evidence of the relation between
subacute inclusion-body encephalitis and measles
virus.
Lancet II, 129.

- GILBERT, Y. et J. MONNIER, 1962: Adaption du virus de la peste des petits ruminants aux cultures cellulaires. Rev. Elev. 15, 321.
- GREENHAM, L., M. FERGUSON and D. PEACOCK, 1974: SSPE measles virus: non-productive and productive infection in Vero-cells and suckling mice. Med. Microbiol. Immunol. 160, 201.
- HALL, W. and S.J. MARTIN, 1973: Purification and characterization of measles virus. J. gen. Virol. 19, 175.
- HALL, W.W. and V. TER MEULEN, 1976: RNA homology between subacute sclerosing panencephalitis and measles viruses. Nature 264, 474.
- HASPEL, M.V., P.R. KNIGHT, R.G. DUFF and F. RAPP, 1973: Activation of a latent measles virus infection in hamster cells. J. Virol. 12, 690.
- HENEEN, W.K., A. LEVAN and W.W. NICHOLS, 1973: Ultrastructure of a measles carrier human cell line. Path. microbiol. Scand. Sect. 81, 281.
- HORNE, R.W. and P. WILDY, 1961: Symmetry in virus architecture. Virology 15, 348.
- HORTA-BARBOSA, L., D.A. FUCCILLO, J.L. SEVER and W. ZEMAN, 1969: Subacute sclerosing panencephalitis: isolation of measles virus from brain biopsy. Nature 221, 974.

- HUANG, A.S., D. BALTIMORE and M.A. BRATT, 1971: Ribonucleic acid polymerase in virions of Newcastle disease virus: comparison with the vesicular stomatitis virus polymerase.
J. Virol. 7, 389.
- IWASAKI, Y. and H. KOPROWSKI, 1974: Cell-to-cell transmission of virus in the central nervous system:
1. Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE).
Lab. Invest. 31, 187.
- JACKSON, G.G. and R.L. MULDOON, 1973: Viruses causing common respiratory infections in man.
II. Enteroviruses and paramyxoviruses.
J. inf. Dis. 128, 387.
- KALLMAN, F., J.M. ADAMS, R.C. WILLIAMS and D.T. IMAGAWA, 1959: Fine structures of cellular inclusions in measles virus infections.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 6, 379.
- KATZ, M., S. OYANAGI and H. KOPROWSKI, 1969: Subacute sclerosing panencephalitis: structures, resembling myxovirus nucleocapsids in cells cultured from brains.
Nature 222, 888.
- KILEY, M.P., R.H. GRAY and F.E. PAYNE, 1974: Replication of measles virus: distinct species of short nucleocapsids in cytoplasmic extracts of infected cells.
J. Virol. 13, 721.
- KINGSBURY, D.W., 1962: Use of actinomycin D to unmask RNA synthesis induced in Newcastle disease virus.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 9, 156.

- KINGSBURY, D.W., 1966: Newcastle disease virus RNA.
II. Preferential synthesis of RNA complementary
to parental viral RNA by chick embryo cells,
J. molec. Biol. 18, 204.
- KINGSBURY, D.W. 1972: Paramyxovirus replication.
Curr. Top. Micr. Imm. 59, 1.
- KINGSBURY, D.W., 1973: Cell-free translation of paramyxo-
virus messenger RNA.
J. Virol. 12, 1020.
- KINGSBURY, D.W., 1974: The molecular biology of paramyxo-
viruses.
Med. Microbiol. Immunol. 160, 73.
- KLENK, H.D. and P.W. CHOPPIN, 1969a: Clinical composition
of the parainfluenza virus SV₅.
Virology 37, 155.
- KLENK, H.D. and P.W. CHOPPIN, 1969b: Lipids of plasma membranes
of monkey and hamster kidney cells and of para-
influenza virions grown in these cells.
Virology 38, 255.
- KNIGHT, P., R. DUFF and F. RAPP, 1972: Latency of human
measles virus in hamster cells.
J. Virol. 10, 995.
- KNIGHT, P., P. DUFF, R. GLASER and F. RAPP, 1974: Character-
istics of the release of measles virus from latently
infected cells after co-cultivation with BSC 1 cells.
Intervirology 2, 287.

- KOESTNER, A. and J.F. LONG, 1970: Ultrastructure of canine distemper virus in explant tissue cultures of canine cerebellum.
Lab. Invest. 23, 196.
- KUROYA, M., N. ISHIDA and T. SHIRATORI, 1953: Newborn viruspneumonitis (type Sendai). II. The isolation of a new virus possessing hemagglutinin activity.
Yokohama Med. Bull. 4, 217.
- LANDSBERGER, F.R., R.W. COMPANS, P.W. CHOPPIN and J. LENARD, 1973: Organization of the lipid phase in viral membrans. Effects of independent variation of the lipid and protein composition.
Biochemistry 12, 4498.
- LIESS, B., 1966: Untersuchungen über das Virus der Rinderpest unter Verwendung von Zellkulturen.
Arch. Vet. Med. 20, 157 und 203.
- MARCUS, P.I., S.J. CIECIURA and T.T. PUCK, 1956: Clonal growth in vitro of epithelial cells from normal human tissues.
J. exp. Med. 104, 615.
- MARTINEZ, A.J., T. OHYA, J.T. JABBOUR and D. DUENAS, 1974: Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). Reappraisal of nuclear, cytoplasmic and axonal inclusions. Ultrastructural study of eight cases.
Acta Neuropath. 28, 1.
- MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK und G. WITTMANN, 1974: Virologische Arbeitsmethoden, Bd. I.
G. Fischer Verlag, Stuttgart.

- MELNICK, J.L. and R.M. McCOMBS, 1966: Classification and nomenclature of animal viruses.
Progr. med. Virol. 8, 400.
- MENNA, J.H., A.R. COLLINS and T.D. FLANAGAN, 1975: Characterization of an in vitro persistent state measles virus infection: establishment and virological characterization of the BGM/MV cell line.
Infect. Immun. 11, 152.
- MEULEN, V. TER, H. KOPROWSKI, Y. IWASAKI, Y.M. KÄCKELL and D. MÜLLER, 1972a: Fusion of cultured multiple sclerosis brain cells with indicator cells: presence of nucleocapsids and virions and isolation of parainfluenza type virus.
Lancet II, 1.
- MEULEN, V. TER, Y. KÄCKELL, D. MÜLLER, M. KATZ and R. MEYER-MANN, 1972b: Isolation of infectious measles virus in measles encephalitis.
Lancet II, 1172.
- MEULEN, V. TER, M. KATZ, Y.M. KÄCKELL, G. BARBANTI-BRODANO, H. KOPROWSKI and E.H. LENNETTE, 1972c: Subacute sclerosing panencephalitis: in vitro characterization of viruses, isolated from brain cells in culture.
J. inf. Dis. 126, 11.
- MEULEN, V. TER, M. KATZ, and D. MÜLLER, 1972d: Subacute sclerosing panencephalitis.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 57, 1.
- MIMS, C.A. and F.A. MURPHY, 1973: Parainfluenza virus Sendai infection in macrophages, ependyma, choroid plexus, vascular endothelium and respiratory tract of mice.
Am. J. Pathol. 70, 315.

- MORGAN, C. and C. HOWE, 1968: Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. IX. Entry of parainfluenza I (Sendai) virus. J. Virol. 2, 1122.
- MOUNTCASTLE, W.E., R.W. COMPANS, L.A. CALIGUIRI and P.W. CHOPPIN, 1970: Nukleocapsid protein subunits of Simian virus 5, Newcastle disease virus and Sendai virus. J. Virol. 6, 677.
- MOUNTCASTLE, W.E., R.W. COMPANS and P.W. CHOPPIN, 1971: Proteins and glycoproteins of paramyxoviruses. A comparison of Simian virus 5, Newcastle disease virus and Sendai virus. J. Virol. 7, 47.
- MUSSGAY, M. and J. WEIBEL, 1962: Early stages of infection with Newcastle disease virus as revealed by electron microscopy. Virology 16, 506.
- NAKAI, T., F.L. SHAND and A.F. HOWATSON, 1969: Development of measles in vitro. Virology 38, 50.
- NAKAI, M., D.T. IMAGAWA, 1969: Electron microscopy of measles virus replication. J. Virol. 3, 187.
- NAKAJIMA, H. and J. OBARA, 1967: Physicochemical studies of Newcastle disease virus. III. The content of virus nucleic acid and its sedimentation pattern. Arch. ges. Virusforsch. 20, 287.

- NORRBY, E., 1962: Hemagglutination by measles virus. II. Properties of the hemagglutinin and of the receptors on the erythrocytes. Arch. ges. Virusforsch. 12, 164.
- OYANAGI, S., V. TER MEULEN, D. MÜLLER, M. KATZ and H. KOPROWSKI, 1970: Electron microscopic observations in subacute sclerosing panencephalitis brain cell cultures: their correlation with cytochemical and immunocytological findings. J. Virol. 6, 370.
- OYANAGI, S., L.B. RORKE, M. KATZ and H. KOPROWSKI, 1971a: Histopathology and electron microscopy to three cases of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). Acta neuropath. 18, 58.
- OYANAGI, S., V. TER MEULEN, M. KATZ and H. KOPROWSKI, 1971b: Comparison of subacute sclerosing panencephalitis and measles viruses: an electron microscope study. J. Virol. 7, 176.
- PAYNE, F.E., J.V. BAUBLIS and H.H. ITABASHI, 1969: Isolation of measles virus from cell cultures of brain from a patient with subacute sclerosing panencephalitis. New Engl. J. Med. 281, 585.
- PFEIL, C., 1975: In-vitro-Versuche zur Bestimmung des Wirtsspektrums und zur Gewinnung von infektiösem Virus bei dem defekten Paramyxovirus 107. Vet. med. Diss. München.
- PLOWRIGHT, W. and R.D. FERRIS, 1959: Studies with rinderpest virus in tissue culture. 1. Growth and cytopathogenicity. J. comp. Path. 69, 152.

- PLOWRIGHT, W., 1968: Rinderpestvirus.
Virology Mon. 3, 25.
- PORTNER, A. and D.W. KINGSBURY, 1971: Homologous interference by incomplete Sendai virus: changes in virus specific RNA.
J. Virol. 8, 388.
- RAINE, C.S., L.A. FELDMANN, R.D. SHEPPARD and M.B. BORNSTEIN, 1973: Subacute sclerosing panencephalitis virus in cultures of organized central nervous tissue.
Lab. Invest. 28, 627.
- RECZKO, E. und K. BÜGEL, 1962: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Verhalten eines vom Kalb isolierten Parainfluenza 3-Virus in Kälbernieren.
Arch. ges. Virusforsch. 15, 487.
- REYNOLDS, E.S., 1963: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.
J. Cell. Biol. 17, 208.
- ROBINSON, W.S., 1971: Sendai virus RNA synthesis and nucleocapsid formation in the presence of cycloheximide.
Virology 44, 494.
- ROLLE, M. und A. MAYR, 1978: Mikrobiologie und Seuchenlehre.
4. Aufl.
F. Enke Verlag, Stuttgart.
- ROSEN, L., 1961: Hemagglutination and hemagglutination inhibition with measles virus.
Virology 13, 139.
- RUBIN, H., 1957: The production of virus by Rous sarcoma cells.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 68, 459.

- RUSTIGIAN, R., 1966: Persistent infection of cells in culture by measles virus. I. Development and characteristics of Hela sublines persistently infected with complete virus.
J. Bacteriol. 92, 1792.
- SCHEID, A. and P.W. CHOPPIN, 1973: Isolation and purification of the envelope proteins of Newcastle disease virus.
J. Virol. 11, 263.
- SCHEID, A. and P.W. CHOPPIN, 1974: Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus.
Virology 56, 475.
- SCHLUEDERBERG, A. and S. CHAVANICH, 1974: The role of the nucleus in measles virus replication.
Med. Microbiol. Immunol. 160, 85.
- SILVERSTEIN, S.C. and P.T. MARCUS, 1964: Early stages of Newcastle disease virus Hela cell interaction: an electron microscopic study.
Virology 23, 370.
- TAJIMA, M., T. USHIJIMA, S. KISHI and J. NAKAMURA, 1967: Electron microscopy of cytoplasmic inclusion bodies in cells infected with rinderpest virus.
Virology 31, 92.
- TANAKA, R., Y. IWASAKI and H. KOPROWSKI, 1975: Experimental parainfluenza-type-1-virus-induced encephalopathy in the adult mouse.
Am. J. Pathol. 79, 335.

- TAWARA, J.T., J.R. GOODMAN, D.T. IMAGAWA and J.M. ADAMS, 1961:
Fine structure of cellular inclusions in experimental measles.
Virology 14, 410.
- TAWARA, J., 1965: Fine structure of filaments in dog kidney cell cultures infected with measles virus.
Virology 25, 322.
- THEIN, P., A. MAYR, V. TER MEULEN, H. KOPROWSKI, Y.M. KÄCKELL, P. MÜLLER and R. MEYERMANN, 1972: Subacutesclerosing panencephalitis. Transmission of the virus to calves and lambs.
Arch. Neurol. 27, 540.
- TOZAWA, H., M. WATANABE and N. ISHIDA, 1973: Structural components of Sendai virus. Serological and physico-chemical characterization of hemagglutinin subunit associated with neuraminidase activity.
Virology 55, 242.
- UEDA, S., Y. OKUNO, Y. HAMAMOTO and H. OHYA, 1975: Subacute sclerosing panencephalitis. Isolation of a defective variant of measles virus from brain obtained at autopsy.
Biken J. 18, 113.
- UNDERWOOD, B. and F. BROWN, 1974: Physico-chemical characterization of rinderpest virus.
Med. Microbiol. Immunol. 160, 125.
- WATERS, D.J. and R.H. BUSSEL, 1974: Isolation and comparative study of the nucleocapsids of measles and canine distemper viruses from infected cells.
Virology 61, 64.

- WATERSON, A.P., J.G. CRUICKSHANK, G.D. LAURENCE and A.D. KANAREK, 1961: The nature of measles virus. Virology 15, 379.
- WATERSON, A.P., 1962: Two kinds of myxovirus. Nature 193, 1163.
- WATERSON, A.P., 1965: Measles Virus. Arch. ges. Virusforsch. 16, 57.
- WHEELOCK, E.F. and I. TAMM, 1959: Mitosis and division in Hela cells infected with influenza or Newcastle disease virus. Virology 8, 532.
- WINSTON, S.H., R. RUSTIGIAN and M.S. BRATT, 1973: Persistent infection of cells in culture by measles virus. III. Comparison of virusspecific RNA synthesized in primary and persistent infection in Hela cells. J. Virol. 11, 926.
- WIZIGMANN, G., 1972: Untersuchungen über Ätiologie, Epidemiologie und Bekämpfung der Rindergrippe. Habilitationsschrift, Tierärztl. Fakultät, Universität München.
- WIZIGMANN, G., 1974a: Untersuchungen über Epidemiologie und Ätiologie der Rindergrippe: I. Vorkommen und Verbreitung von bovinen Adenoviren, Rhinoviren, Reoviren und Parainfluenza 3-Virus. Zbl. Vet. Med. B, 21, 563.
- WIZIGMANN, G., 1974b: Untersuchungen über Epidemiologie und Ätiologie der Rindergrippe: II. Mitbeteiligung von bovinen Adenoviren, Rhinoviren, Reoviren und Parainfluenza 3-Virus bei Rindergrippe-Erkrankungen. Zbl. Vet. Med. B, 21, 580.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr
gilt mein Dank für die Bereitstel-
lung des Arbeitsplatzes.

Für die Überlassung des Themas,
die allzeit hilfreiche Unterstützung
und das harmonische Arbeitsklima
danke ich Herrn Prof. Dr. H. Mahnel
und Herrn Prof. Dr. P.A. Bachmann
sehr herzlich.

Während der Anfertigung der Arbeit
stand mir ein Stipendium nach dem
Graduiertenförderungsgesetz zur
Verfügung.

Lebenslauf

Am 1. Januar 1950 wurde ich, Brigitte Julianne Hüppe, geb. Kröniger, als zweite Tochter des Kaufmannes Julius Kröniger und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Nägele, in Birkenfeld/Nahe geboren.

Von 1956-1960 besuchte ich die Volksschule in Birkenfeld, von wo ich auf das Staatl. Neusprachl. Gymnasium in Birkenfeld überwechselte und dort 1969 mit dem Abitur abschloß.

Im Wintersemester 1969/70 begann ich in München mit dem Studium der Veterinärmedizin und legte am 4. April 1975 das Staatsexamen ab.

Die Bestallung als Tierärztin erhielt ich am 21. Mai 1975.

Seit dem 22. April 1976 bin ich mit dem Medizinalassistenten Gerd Michael Hüppe verheiratet.

Mit der vorliegenden Arbeit begann ich am 15. Mai 1975 im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin im Fachbereich Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München.

